UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
Année 1960 - N° 480

Application de la Méthode Polarographique à l'Analyse de Quelques Colorants Basiques

THÈSE

pour le DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de LYON
Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement devant la
FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON
le 30 Novembre 1960

par

Jean THUREL
Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon
Né le 17 Février 1934, à LYON

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ANNÉE 1960 — N° 480

Application de la Méthode Polarographique à l'Analyse de Quelques Colorants Basiques

THÈSE

pour le DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de LYON
Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement devant la
FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON
le 30 Novembre 1960
par

Jean THUREL
Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon
Né le 17 Février 1934, à LYON

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
& DE PHARMACIE DE LYON

PARSONNEL DE LA FACULTE

M. J. Lepine : Doyen Honoraire

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

M. M. LEVRAT : Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, CADE, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND , MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY .

Professeurs

MM.	HERMANN	Physiologie
	CIBERT	Clinique Urologique
	PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
	DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique & hygiène mentale
	ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
	CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
	WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
	PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
	FROMENT	Clinique & prophylaxie cardio-vasculaires
	CROIZAT	Clinique médicale C
	ENSELME	Chimie biologique et médicale
	MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
	GUILLEMINET	Clinique chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile
	REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
	POLLOSSON	Clinique gynécologique
	PIGEAUD	Clinique obstetricale
	BOURRET	Médecine du travail
	LEVRAT	Clinique médicale A
	SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
	DUCLOS	Clinique stomatologique
	BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
	JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie

NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie et Pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et deontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique Oto-rhino-laryngologique
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL Jean	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
KEHL	Histologie
PAPILLON	Radiologie
X ...	Clinique des maladies infectieuses et bactériologie
X ...	Hydrologie thérapeutique, climatologie & écologie sociale

Professeurs à titre personnel

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
DORCHE	Technologie pharmaceutique

Professeurs titulaires sans chaire

BANSSILLON	Obstétrique
ROMAN	Parasitologie
BERTOYE	Bactériologie
CIER J.François	Physiologie
CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie et pharmacologie
PERROT Louis	Chimie organique et toxicologie

Maîtres de Conférences-Agrégés

FEROLDI	Anatomie pathologique
CREYSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie

BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT L.Prosper	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN J.Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique
ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie

Agrégés en exercice

LECUIRE	chargé d'enseignement	Neuro-chirurgie
GONIN André	d°	Cardiologie
MATHIEU Jacques		Obstétrique
MARION Joseph		Orthopédie
PONT Maurice	chargé d'enseignement	Propédeutique médicale
VIGNON Georges	d°	Pathologie médicale
REVOL Louis	d°	Pathologie médicale
JAUBERT de BEAUJEU	d°	Pathologie chirurgicale
TRAEGER Jules	d°	Médecine générale
GUILLEMIN Georges	d°	Pathologie chirurgicale
BURTHIAULT René	d°	Obstétrique
FRANCOIS René	d°	Pédiatrie, Puériculture
GUINET Paul		Médecine générale
SAUTOT Jean		Pathologie chirurgicale
MARION Pierre		Chirurgie générale
MICHAUD Pierre		Chirurgie générale
MONNET Paul		Maladies infectieuses
GIGNOUX Marcel		O.R.L.
FREIDEL Charles		Stomatologie
PLAUCHU Marcel		Médecine générale
DEVIC Michel	chargé d'enseignement	Pathologie médicale
COLIN Marcel	d°	Médecine légale
GUYOTAT Jean	d°	Neurologie
DUMONT Martial	d°	Obstétrique
DURAND Louis Noël	d°	Urologie
FRANCILLON Jacques	d°	Chirurgie générale

DESPIERRES Charles	Médecine générale
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
SAUBIER Eugène	Chirurgie générale
COLOMB Daniel	Dermatologie
TOLOT François	Médecine du travail
SCHOTT Bernard	Neurologie Psychiatrie
BONAMOUR Georges	Ophtalmologie

Examinateurs de la Thèse

MM. DREVON B.
BADINAND A.
PERROT L.
CIER A.

A MA MERE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0045

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur B. DREVON

Professeur de Pharmacie et de Pharmacologie
Agrégé du Val-de-Grâce
Chevalier de la légion d'Honneur

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux
Chevalier de la légion d'Honneur

Monsieur le Professeur Agrégé L.PERROT

Pharmacien des Hôpitaux

Monsieur le Professeur Agrégé A. CIER

AVANT-PROPOS

Au cours de ce travail qu'il a bien voulu nous confier, nous avons toujours trouvé auprès de Monsieur le Professeur B.DREVON les plus grandes facilités et les meilleurs conseils. Très sensible à l'honneur qu'il nous fait en présidant notre Thèse, nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde gratitude.

Après nous avoir permis de réaliser dans son Laboratoire quelques uns des essais à la base de ce travail, Monsieur le Professeur BADINAND a bien voulu siéger parmi nos juges. Nous lui présentons nos respectueux remerciements.

Monsieur le Professeur PERROT a accepté d'être notre juge. Nous le remercions très respectueusement.

Dès le début de ce travail Monsieur le Professeur CIER nous a conseillé avec une très grande amabilité. Nous le remercions vivement d'être parmi nos juges et l'assurons de notre profond respect. Nous désirons encore, à l'occasion de travail, exprimer notre reconnaissance à Monsieur le Pharmacien - Commandant MERGIER. Il nous a toujours manifesté un intérêt très bienveillant et nous avons trouvé en lui un conseiller très sûr. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

I. INTRODUCTION

La variété des colorants synthétiques, le champ très étendu de leurs applications, leur addition - licite ou frauduleuse - aux denrées alimentaires, aussi bien que leur emploi comme médicaments, posent à l'analyste des problèmes dont la diversité même implique une multiplicité de techniques parmi lesquelles il est parfois difficile de faire un choix.

L'isolement, la caractérisation et le dosage des colorants acides ont fait l'objet, en 1958, au Laboratoire de Pharmacie chimique et Pharmacologie, d'une étude conduite par A. LAUR sur un principe nouveau. Ces colorants, en effet, forment avec certains ammoniums quaternaires des "complexes" , solubles dans les solvants organiques. Une chromatographie de ces combinaisons, suivie d'élution, permet de résoudre avec élégance et précision le triple problème posé à l'analyste (24, 52).

Cette méthode n'est pas valable pour les colorants basiques. Les solvants organiques sont bien susceptibles d'extraire directement ces derniers des milieux qui les contiennent, mais les méthodes habituelles de l'analyse (colorimétrie, spectrométrie, spectrométrie de fluorescence, chromatographie, électrophorèse.....) leur sont difficilement applicables.
C'est la raison pour laquelle il nous a été demandé d'étudier les possibilités offertes par la polarographie dans le cas des colorants basiques. L'identification et le dosage de quelques colorants dérivés du triphényl méthane a constitué le point de départ de ce travail. Encouragés par les résultats obtenus, nous avons tenté d'appliquer cette méthode d'analyse à d'autres colorants basiques de structure voisine (53) et à certains azoïques basiques.

Le problème qui nous était proposé pourrait être considéré comme résolu si nous avions été assez heureux pour trouver un moyen simple et général d'amener les colorants à doser sous un état tel que la polarographie soit toujours possible. Un tel moyen reste à trouver. Heureusement, dans de nombreux cas courants, la polarographie peut être utilisée sans précautions préalables. Lorsque c'est le cas - et notre Thèse en fournit de nombreux exemples - la méthode polarographique peut être considérée, dans l'état actuel de nos connaissances, comme la méthode de choix.

2. METHODES GENERALES D'ANALYSE DE COLORANTS

Avant de passer sommairement en revue les différentes méthodes proposées jusqu'ici pour l'analyse des colorants - plus spécialement des colorants basiques - il est utile de préciser que nous n'envisagerons ici que l'aspect purement analytique du problème (identification, dosage) , laissant de côté la phase délicate et importante que constitue l'extraction des colorants des milieux où ils se trouvent. Nous nous contenterons de rappeler que pour réaliser cette extraction différentes méthodes ont été proposées : teinture de la laine, épuisement par divers solvants organiques et plus récemment utilisation de la solubilité dans les solvants organiques de la combinaison formée entre les ammoniumsquaternaires et les colorants acides. Actuellement, l'analyse proprement dite d'un colorant se fait par des méthodes physiques qui permettent d'effectuer simultanément son isolement, son identification, voire même son dosage. Avant l'apparition de ces techniques récentes, isolement et identification des colorants constituaient deux temps distincts de l'analyse. L'isolement (parfois désigné par le terme de "séparation") était alors réalisé par différentes méthodes qui paraissent perimées de nos jours telles que séparation par précipitation, par stratification de divers solvants en mélange, par adsorption sélective sur mouchets de laine ou sur d'autres adsorbants, par analyse capillaire, par dialyse, etc...
Un article très complet publié par LHOEST (60) en 1953 passe en revue ces différents procédés.

Quant à l'identification des colorants, si l'on fait abstraction des méthodes spectroscopiques préconisées par FORMANEK au début de ce siècle, elle reposait uniquement jusqu'à ces toutes dernières années sur des méthodes chimiques. Les plus classiques comme le rappelle Madame RUIZ (78) sont celles de GREEN (31) et de ROTA (44).

La méthode de ROTA permet l'identification jusqu'au stade du groupe chimique (par exemple oxazines, thiazines). Pour une identification plus poussée, l'auteur renvoie aux traités spéciaux. Quant à la méthode de GREEN utilisée dans l'industrie textile, elle représente la forme la plus complète et la plus connue de la méthode chimique, permettant l'identification de la "famille" et souvent même de la constitution chimique du colorant. La méthode de GREEN a par contre l'inconvénient d'être [illegible] longue et délicate.

Après ce très bref rappel des méthodes d'analyse de colorants autrefois utilisées, nous allons envisager de manière un peu plus détaillée les différentes méthodes physiques auxquelles le chimiste d'aujourd'hui peut avoir recours pour analyser un mélange de colorants.

21. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

211. Chromatographie d'adsorption sur colonne

Cette méthode a souvent permis, avec un appareillage simple, et grâce au choix convenable de l'adsorbant et de l'éluant, de réaliser de très bonnes séparations. Il est donc normal qu'on ait cherché à l'utiliser pour fractionner des mélanges de colorants, d'autant que, bien souvent, cette technique permet de réaliser simultanément la séparation et l'identification, soit directement en repérant la position des fractions sur la colonne, soit indirectement en examinant les fractions éluées. Comme le signalent GILLAM et STERN (30) la chromatographie sur colonne associée à l'examen spectrométrique des éluats (détermination des maxima d'absorption) constitue une technique classique d'analyse des colorants.

Un des premiers exemples de l'utilisation d'un adsorbant pour séparer des colorants en mélange nous est fourni par RUGGLI et Coll. (74-75) cité par LEDERER (56). Cet auteur étudie le

comportement chromatographique sur colonne d'alumine de différents colorants parmi lesquels des dérivés aziniques, acridiniques et des dérivés du di- et du triphénylméthane. Ce procédé a été repris par Madame RUIZ (77) pour l'analyse de colorants alimentaires. Les résultats obtenus avec les colorants basiques dérivant du di- et du triphénylméthane ne furent pas très encourageants, ce qui a conduit l'auteur à remplacer l'oxyde d'aluminium -adsorbant basique- , par un adsorbant acide tel que la silice. Dans la série des acridines le comportement de la mépacrine et de ses produits d'excrétion urinaire a été étudié par KING et Coll. en 1946 (43) par chromatographie sur alumine.

212. Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est sans aucun doute la méthode qui a été jusqu'ici le plus largement mise à profit pour l'analyse des colorants (colorants acides ajoutés aux aliments en particulier) , ainsi qu'en témoigne le grand nombre de références citées dans les ouvrages généraux de chromatographie (9, 55, 56). Les différentes variantes de la chromatographie sur papier ont été essayées : chromatographie mono ou bidimensionnelle, sur papier ordinaire ou sur papier traité (papier aluminé par exemple). La séparation et l'identification des colorants peuvent se faire simultanément, l'identification étant basée sur la mesure du Rf ou rapport de la distance parcourue par la substance à la distance parcourue par le solvant. Le procèdé n'est valable que dans la mesure où les Rf des colorants sont suffisamment distincts. En outre, il est indispensable de se placer dans des conditions parfaitement définies et d'opérer en présence de témoins. A la mesure du Rf il est bon d'associer d'autres moyens d'identification : examen du chromatogramme lui-même, ou de la solution obtenue par élution du spot. La couleur du spot, l'examen en lumière de Wood du chromatogramme peuvent être utilisés. Un élégant procédé décrit par LANGER (51), est fondé sur une identification

polarographique directe : le chromatogramme est placé sur un bloc de porcelaine poreux en partie immergé dans une solution saturée de chlorure de potassium dans laquelle plonge l'électrode au calomel, la cathode étant constituée par un fil d'or amalgamé.

En outre, dans certains cas, on pourra réaliser soit sur le chromatogramme lui-même soit sur l'éluat, différentes réactions qui, sans être toujours spécifiques, sont néanmoins très utiles (29) .

A condition de suivre un processus opératoire rigoureusement déterminé, les méthodes chromatographiques peuvent devenir des méthodes d'analyse quantitative. La chromatographie quantitative peut se faire par photomètrie directe des taches colorées sur le papier, par photographie et lecture densitométrique du négatif, ou mieux encore, par dosage colorimétrique après élution du colorant. La précision peut, dans ce cas atteindre $\pm$ 2 p. 100 (52).

Si de très nombreuses publications ont été consacrées à la chromatographie des colorants acides et ont souvent fourni des résultats très satisfaisants, il ne parait pas, sauf rares exceptions, en avoir été de même pour les colorants basiques. THALER et SOMMER (89) utilisant comme solvant une solution ammoniacale de citrate de sodium, et plus récemment, LAUR (52) à l'aide de papiers spéciaux, ont tenté la séparation chromatographique de colorants alimentaires, mais n'ont obtenu que des résultats décevants dans le cas des colorants basiques notamment ceux dérivés du di- et du triphénylméthane. En revanche, d'après LEDERER (54) il semble possible d'obtenir une très bonne séparation chromatographique de différentes acridines utilisées comme médicaments en réalisant une chromatographie bidimensionnelle.

22. METHODES ELECTROPHORETIQUES

Quelques travaux récents ont été effectués pour appliquer l'électrophorèse à la séparation et à l'identification de colorants. Là encore, les travaux ont surtout porté sur les colorants alimentaires acides. Néanmoins, LEDERER (54), étudiant simultanément les comportements chromatographique et électrophorétique de diverses acridines, observe des vitesses de migration différentes suivant les composés mis en oeuvre. Dans le même temps, EVANS et WALL (27) cités par LEDERER (57) utilisaient ce procédé pour examiner des mélanges de colorants employés en Bactériologie, parmi lesquels le bleu de méthylène et le violet cristallisé. Plus récemment, LEGRAND (59), après avoir appliqué l'électrophorèse à la détection de différents colorants jaunes (jaune naphtol, jaune de quinoléine, auramine) dans la moutarde deDijon, étendait sa méthode à l'identification d'autres colorants alimentaires synthétiques, parmi lesquels plusieurs dérivés basiques du triphénylméthane. L'identification des colorants par cette méthode se fait en examinant la position et l'aspect des diverses fractions sur l'électrophorégramme en lumière ultra-violette et à la lumière du jour.

23. METHODES SPECTROMETRIQUES

Alors que les techniques précédentes constituent le plus souvent des procédés de séparation et d'identification, la spectrométrie paraît avoir été surtout utilisée aux fins d'identification ; elle complète alors heureusement la chromatographie ou l'électrophorèse.

231. Détermination du spectre d'absorption

Cette méthode d'identification des colorants est très ancienne. Dès le début de ce siècle, FORMANEK cité par GILLAM et STERN (30) avait établi les spectres d'absorption de nombreux

colorants dans des solvants divers et décrit un système permettant au moyen de quelques réactions simples complémentaires, de les identifier.

Dans l'industrie des colorants, la détermination du spectre d'absorption dans le visible et dans l'ultra-violet a été et est encore largement employée (67) que ce soit au stade de la fabrication ou à celui du contrôle.

232. Spectrométrie de fluorescence.

De nombreux colorants étant fluorescents en lumière de Wood, on a pu utiliser cette propriété pour les identifier (72). C'est ainsi, par exemple que les acridines en solution très diluée présentent une fluorescence intense, et, comme le signale ALBERT (2) cette propriété a été mise à profit pour l'étude de l'élimination des médicaments acridiniques.

24. MÉTHODE POLAROGRAPHIQUE

Cette méthode découverte en 1921 per HEYROVSKY, et qui valut à son auteur le prix NOBEI de Chimie, repose sur l'interprétation de la courbe représentant la variation de l'intensité du courant d'électrolyse en fonction de la tension appliquée entre une cathode polarisée, et une anode non polarisable, plongeant dans le liquide à analyser, lorsqu'on fait varier la différence de potentiel entre les deux électrodes. La cathode, en général constituée par une goutte de mercure, présente un potentiel variable, alors que celui de l'anode est constant.

La Polarographie constitue une méthode d'analyse qualitative lorsqu'on se contente de déterminer le potentiel de demi-vague E 1/2 qui peut être défini comme la valeur du potentiel de la cathode, lorsque le courant d'électrolyse est égal à la moitié du courant limite total. Elle peut, en outre, devenir une méthode d'analyse quantitative si, pour des conditions expérimentales parfaitement déterminées, la hauteur de la vague polarographique

c'est-à-dire l'intensité du courant d'électrolyse est proportionnelle à la concentration du corps réduit ou oxydé à la cathode :

$$id = k\ C$$

Connue et étudiée depuis plusieurs dizaines d'années, la Polarographie offre des possibilités encore incomplètement explorées, surtout en Chimie Organique, ainsi qu'en témoignent les nombreuses publications qui lui ont été consacrées (93). Cette méthode a fait l'objet d'ouvrages récents qui traitent de manière détaillée de sa théorie et de ses applications (7, 12, 22, 35, 46, 65, 69, 98). L'idée d'utiliser la polarographie dans l'analyse des colorants n'est pas nouvelle. Dès 1948, KOLTHOFF (47) puis DELAHAY (21) étudiaient déjà la polarographie de la phénol-phtaléine et de la fluorescéine. BERG (6), un peu plus tard, déterminait le comportement polarographique de nombreux colorants acides ou basiques. Plusieurs travaux récents ont été également consacrés à la polarographie de colorants alimentaires acides : KITAGAWA et Coll. (45), DORLET (23a). Récemment, en 1959, une méthode industrielle a été décrite pour le dosage polarographique de l'acridine (76).

3. APPAREILLAGE POLAROGRAPHIQUE

31. LES POLAROGRAPHES

La majorité de nos essais a été réalisée sur un polarographe Du BELLAY à inscription manuelle. Néanmoins, grâce à l'amabilité de monsieur le Professeur BADINAND, nous avons pu réaliser quelques essais comparatifs sur un polarographe automatique RADIOMETER. Le polarographe Radiometer présente sur le polarographe Du Bellay plusieurs avantages qui tiennent à sa plus grande sensibilité, à la rapidité de l'enregistrement et enfin à la possibilité d'enregistrer la courbe dérivée.

311. Sensibilité de l'appareil

En se plaçant dans les meilleures conditions de sensibilité le polarographe Du Bellay permet d'étaler 0,64 µA sur 40 cm c'est-à-dire qu'un déplacement du spot de 1mm correspond à une variation d'intensité de $1,6 \times 10^{-3}$ µA, alors que le polarographe Radiometer permettra d'étaler 0,02 µA sur 25 cm soit $0,8 \times 10^{-4}$ µA sur 1mm.

La simple comparaison des chiffres ci-dessus montre que, théoriquement, le polarographe Radiometer est 20 fois plus sensible que le polarographe Du Bellay.

312. Rapidité de l'enregistrement

Avec un polarographe Radiometer, l'enregistrement automatique peut se faire à plusieurs vitesses (jusqu'à 0,8 Volt par minute). Néanmoins, d'une manière générale, l'enregistrement se fera soit à 0,2 V/min., soit à 0,4 V/min., c'est-à-dire qu'en cinq minutes au plus, on explorera sans intervention du manipulateur une zone de potentiel de 1 Volt, alors que, pour parvenir au même résultat avec un polarographe Du Bellay, il faudra à un manipulateur entrainé au moins deux fois plus de temps.

313. Polarographie dérivée

Cette méthode d'enregistrement est très séduisante, car elle permet d'obtenir des tracés tout à fait clairs. Elle sera tout particulièrement intéressante, comme le signale SOUCHAY (81), lorsqu'on aura à identifier des produits voisins en mélange, car elle donne la possibilité de séparer des vagues voisines de 50 mV, alors qu'ordinairement des différences de potentiel de demi vague de 100 mV sont nécessaires pour distinguer deux vagues et qu'un dosage correct demande 150 à 200 mV d'écart. Des exemples donnés ultérieurement (fig. 9 et 10) illustrent parfaitement l'intérêt de la polarographie dérivée. Notons, cependant, que l'emploi de la polarographie dérivée en analyse quantitative fournira des résultats moins satisfaisants que la polarographie classique.

La comparaison des deux types de polarographe utilisés s'est montrée jusqu'ici favorable au polarographe Radiometer, mais il convient également de signaler les critiques que l'on peut faire à cet appareil. En effet, outre son prix élevé et sa manipulation plus délicate, il présente l'inconvénient de ne pouvoir étaler au mieux que 0,05 V/cm soit 1 Volt sur 20cm, alors que le polarographe Du Bellay, très maniable, permet d'étaler 1 Volt sur 40 cm, faisant apparaître ainsi plus nettement la forme des vagues et leur éventuelle complexité. Certes, la polarographie dérivée compense en partie cet inconvénient, mais, néanmoins, lorsqu'il s'agit d'un travail de recherche, il est commode de pouvoir étaler largement son polarogramme.

32. LES CELLULES POLAROGRAPHIQUES

La cellule polarographique est la partie de l'appareillage dans laquelle on place la solution à étudier.
De très nombreux modèles de cellule polarographique ont été décrits soit dans les ouvrages généraux sur la Polarographie précedemment cités, soit dans les articles de documentation de

HUME (36). Il convient de signaler les cellules spéciales pour micropolarographie décrites par divers auteurs (38, 66b, 96) qui permettent de travailler sur 0,1ml de liquide, alors que, dans le cas général, un volume de l'ordre de 5ml est nécessaire. On conçoit l'intérêt de telles cellules, lorsque des traces de substance doivent être détectées.

D'une manière générale, la cellule polarographique est construite de façon à pouvoir contenir les trois éléments fixes du dispositif, à savoir : 1°) l'électrode à gouttes de mercure,
2°) le système de désaération,
3°) l'électrode de référence.

En fait, l'électrode de référence permet de classer les cellules polarographiques en deux groupes selon que l'anode utilisée sera une anode "interne" constituée par un bain de mercure, et placée directement en contact avec la solution étudiée ou une anode "externe" séparée de la solution par un pont de gélose chlorurée ou par une membrane poreuse. Lorsque l'anode est interne on verse au fond de la cellule une petite quantité de mercure de façon à avoir un bain de quelques cm2 de surface; un fil de platine assure la jonction entre le mercure et le circuit extérieur. Un modèle simple de ce type de cellule est indiqué fig. 2. L'avantage de cette cellule est d'être très facilement interchangeable et de pouvoir être utilisée sans aucune difficulté soit avec une anode "interne" soit avec une anode "externe". C'est avec une cellule semblable qu'est équipé le polarographe Radiometer, l'anode étant constituée par une électrode au calomel à tube capillaire que l'on plonge directement dans le liquide.

La cellule polarographique que nous avons utilisée lors de nos essais sur polarographe du Bellay est d'un type un peu différent, étant conçue pour fonctionner seulement avec une anode externe (fig. 1). Elle est constituée par un petit tube à collerette muni d'un diverticule latéral poreux qui met en relation

la cellule (et par suite l'électrode à gouttes de mercure) avec l'électrode de référence par l'intermédiaire d'une solution saturée de chlorure de potassium (fig. 4). Bien que d'autres auteurs (22) aient employé des cellules tout à fait similaires, mais à poreux situé au fond du tube, il nous a semblé préférable d'utiliser des cellules à diverticule latéral, car, si l'on veut polarographier plusieurs fois la même solution, on évite ainsi que le poreux soit peu à peu recouvert par le mercure et l'enregistrement polarographique perturbé.

La figure 4 représente le montage général utilisé pour nos essais sur polarographe Du Bellay. On peut distinguer trois parties essentielles :

- Un système de thermostatisation constituée par une cuve (L = 20cm; l = 15cm; h = 15cm) remplie d'eau dont la température sera maintenue à une valeur sensiblement constante au moyen d'une résistance chauffante (type résistance d'aquarium), d'un thermostat (Thermostat type 314 S , Electro methods LTD, Made in England) et d'un agitateur magnetique. Le contrôle de la marche normale du chauffage est fait grâce à une lampe témoin. La cuve, à sa partie inférieure, est traversée par deux tiges de plexiglass sur lesquelles reposera le dispositif polarographique proprement dit.
- Ce dispositif est constitué par une cage cylindrique à double paroi (fig. 3). Dans l'espace limité par cette double paroi, se trouve une solution saturée de chlorure de potassium dans laquelle plongeront l'électrode de référence et les cellules polarographiques.
- Un disque de plexiglass (diamètre = 21,5cm) recouvrant l'ensemble (cage cylindrique et bain thermostatique) s'adapte en position fixe sur la cage cylindrique au moyen de petites butées en plexiglass. Ce disque est perforé de plusieurs trous qui permettront de faire plonger dans la

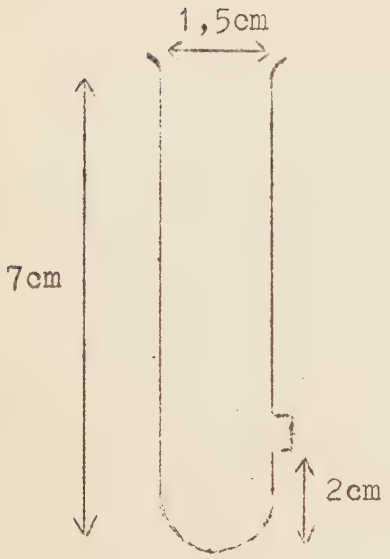


Fig. 1. Cellule polarographique (Polarographe Du Bellay)

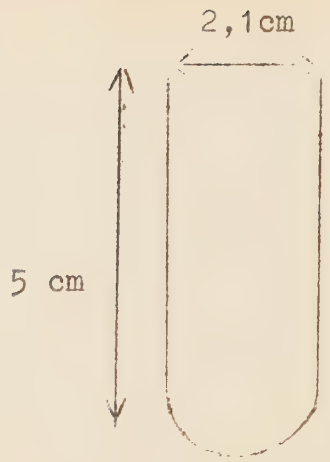


Fig. 2. Cellule polarographique (Polarographe Radiometer)

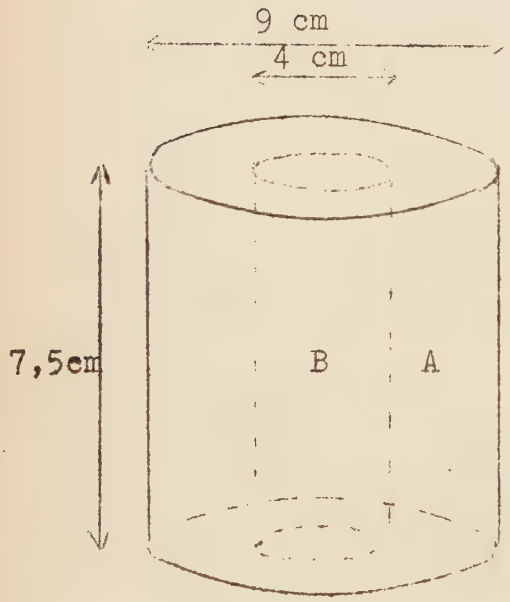


Fig. 3. Cage cylindrique à double paroi
A: Solution saturée de KCl
B: Thermostat plongeant dans l'eau (to = 25°)

Fig. 5. Cellule polarographique (Polarographe Du Bellay) vue en plan

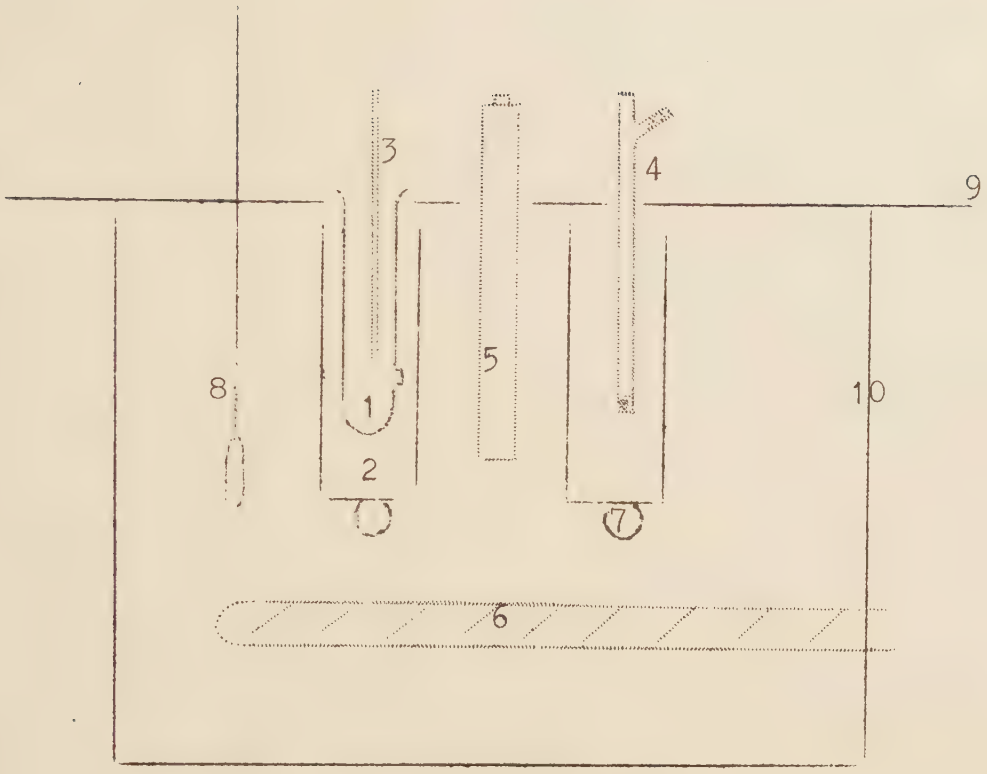


Fig. 4 : Montage général (coupe verticale)

1. Cellule polarographique (plongeant dans solution saturée de ClK).
2. Cylindre à double paroi contenant la solution saturée de ClK.
3. Electrode à gouttes de mercure
4. Electrode au calomel (plongeant dans solution saturée de ClK).
5. Thermostat et sa vis de réglage.
6. Système de chauffage.
7. Support du cylindre à double paroi.
8. Thermomètre.
9. Disque de plexiglass recouvrant l'ensemble et perforé de trous laissant passer les cellules, l'électrode de référence ...
10. Bain d'eau.

solution de chlorure de potassium un thermomètre gradué en 1/10 de degré, l'électrode de référence et les cellules polarographiques, les orifices circulaires où s'engagent les cellules comportant une petite encoche afin que la cellule: et son poreux latéral puissent être introduitsfacilement (fig. 5). Thermomètre et électrode de référence gainés d'une enveloppe de liège ou de polythène se placent exactement dans les orifices prévus. Quant aux cellules, elles plongent dans la solution de chlorure de potassium, mais sont retenues à la surface du disque par leur collerette. En cours de manipulation, la cellule polarographique est recouverte par un large couvercle de polythène perforé de deux trous, par lesquels passent l'électrode à gouttes de mercure et un tube capillaire en polythène par où l'on fait arriver de l'azote, afin d'assurer l'élimination de l'oxygène dissous. Un thermomètre gradué en 1/10 de degré plonge dans le bain thermostatique et permet de vérifier le bon fonctionnement du thermostat.

33. LES ELECTRODES

331. L'anode ou électrode de référence

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, l'électrode de référence peut être soit interne, soit externe. Dans le premier cas, l'anode sera constituée par une couche de mercure, dispositif qui a l'avantage d'être extrêmement simple à réaliser, mais, qui, par contre, n'est pas sans inconvénients. On a coutume, en effet, de rapporter les potentiels de demi-vague à celui de l'électrode au calomel saturée (en anglais, Vs S.C.E.= versus saturated calomel electrode), ce qui permet de comparer aisément entre eux les résultats obtenus par des auteurs différents. L'emploi d'une électrode interne oblige le manipulateur à mesurer pour chaque milieu utilisé le potentiel de l'électrode interne par rapport à celui d'une électrode au calomel saturée.

L'électrode interne présente, en outre, l'inconvénient :
1°) de ne pas pouvoir être utilisée dans certains cas (agents fortement oxydants ou réducteurs),
2°) d'augmenter très notablement la quantité de mercure consommée.
Toutes ces raisons sommairement décrites, nous ont fait choisir comme électrode de référence une électrode externe, et, dès le début de nos essais, nous avons adopté une électrode au calomel saturée (électrode au calomel à remplissage latéral. Jonction par tube poreux) dont le potentiel à 25° par rapport à l'électrode à hydrogène est de + 0,246 Volt.

332. La cathode

3321. Cathode à gouttes de mercure

Nous avons utilisé comme cathode une électrode classique à gouttes de mercure constituée par un tube capillaire d'environ 10cm de long dont la section est telle que, sous une pression de 58cm de mercure, on obtienne une goutte toutes les 3 à 5 secondes. Ce temps définit la "durée de vie d'une goutte". L'électrode est reliée par un tuyau en polythène transparent à un réservoir contenant du mercure propre. La cathode est constituée par la goutte en formation, et, dans le cas général, les substances électrolysées sont amenées à la surface de cette cathode par suite d'un phénomène de diffusion. La surface de la cathode varie continuellement au cours de l'électrolyse et l'accroissement du volume de la goutte en formation compense la diminution de l'intensité du courant due à la lenteur de la diffusion grâce à la proportionnalité entre l'aire de la cathode et l'intensité du courant et aussi au fait que la croissance "périodique" de la goutte de mercure assure le contact avec de nouvelles couches de liquide.
Avec l'électrode à gouttes de mercure, à potentiel constant, l'intensité du courant de polarisation varie pendant la durée de vie d'une goutte; l'équation d' ILKOVIC que l'on peut trouver

dans les ouvrages généraux de Polarographie permet de définir un "courant moyen" stable.

Comme nous l'avons dit précédemment, la cathode à gouttes de mercure est l'électrode la plus fréquemment utilisée en Polarographie. Elle est simple, donc peu coûteuse, et, de plus, elle présente un certain nombre de qualités intéressantes :

- la surface de l'électrode est régulière et très bien définie,
- le renouvellement continuel de l'électrode évite tout risque de contamination (par exemple par dépôt de substance). En outre, en admettant qu'une vibration ou un choc produise une goutte anormale, le comportement de la goutte suivante n'est pas affecté; le "courant moyen" reste très stable.
- la surtension très forte de l'hydrogène sur le mercure empêche, en milieu acide, que la vague de décharge de H^+ ne masque les vagues correspondant aux autres substances présentes.
- La reproductibilité des résultats est excellente.

En revanche, et c'est la raison pour laquelle, comme nous le verrons plus loin, d'autres types d'électrodes ont été utilisés en Polarographie, la cathode à gouttes de mercure présente quelques inconvénients qui sont :

- l'existence d'un courant résiduel important,
- une sensibilité assez médiocre,
- l'existence de maxima sur les courbes représentant les variations d'intensité en fonction de la tension i=f (E).

33211. L'existence d'un courant résiduel important

De nombreux auteurs ont déjà fourni des interprétations de ce phénomène, et, récemment, CHARLOT et Coll. (13) ont expliqué d'une manière claire et détaillée les causes de ce courant résiduel particulièrement important avec l'électrode à gouttes de mercure. Lorsqu'on applique une faible tension entre deux électrodes plongeant dans l'électrolyte de base en l'absence de

toute substance susceptible d'être réduite, on observe cependant toujours le passage d'un faible courant, appelé courant résiduel. Celui-ci est lui-même la somme de deux composants qui sont le "courant résiduel faradaïque" et le "courant résiduel capacitif".

Le"courant résiduel faradaïque" est dû aux traces d'impuretés toujours présentes même dans les réactifs les plus purs et à l'oxygène dissous. Nous verrons d'ailleurs ultérieurement de manière plus détaillée l'influence très importante de l'oxygène dissous sur les vagues polarographiques. Quant au "courant résiduel capacitif", il est dû au fait que l'interface entre la cathode et la solution est équivalente à une double couche électrique qui se comporte comme un condensateur, c'est à dire que, si la cathode est portée à un certain potentiel, le condensateur se charge d'une certaine quantité d'électricité, mais si l'on ferme le circuit d'électrolyse, le condensateur se décharge d'où passage d'un courant dit "courant résiduel capacitif". Lorsqu'on utilise une cathode de forme constante, le courant capacitif s'annule très rapidement et est négligeable, mais il n'en est pas de même lorsqu'on utilise une cathode à gouttes de mercure dont la surface est renouvelée périodiquement : la double couche se décharge pendant la croissance de la goutte et se charge lorsque la goutte se détache. Il en résulte donc un courant capacitif moyen qui constitue une part importante du courant résiduel.

Le courant résiduel est souvent très gênant (cf figures 11 et 12) et, dans certaines zônes de potentiels, plus particulièrement vers -0,05 ou vers -0,9 Volt (potentiels qui correspondent à la réduction de l'oxygène) il limite la sensibilité de la méthode. Les polarographes modernes (Du Bellay, Radiometer) sont équipés d'un système de compensation permettant d'appliquer une tension de contre-courant variant proportionnellement avec la tension du potentiomètre de mesure, le facteur de proportionnalité pouvant être réglé à volonté. On parvient ainsi après règlage convenable à diminuer, voire même à annuler, le courant résiduel dans une étroite zône de potentiels et à réaliser des enregistrements très nets (cf figures 5 et 8).

33212. Une sensibilité assez médiocre

L'enregistrement polarographique d'une substance réductible peut se diviser en trois parties :

- avant la vague : c'est le courant résiduel que nous venons d'étudier,
- la vague proprement dite,
- après la vague : c'est le courant limite

le courant limite d'une vague polarographique est lui-même la somme de trois composants : le courant résiduel, le courant de migration dû au champ électrique autour de l'électrode (éliminé en pratique par l'électrolyte de base) et enfin le courant de diffusion qui dépend d'un certain nombre de facteurs, en particulier de la surface de l'électrode.

Ainsi la petite surface moyenne des gouttes de mercure jointe à l'importance du courant résiduel capacitif permettent déjà d'expliquer la faible sensibilité de l'électrode à gouttes de mercure. En outre, selon l'hypothèse de NERNST, on peut admettre qu'à l'état stationnaire, la diffusion est limitée à une couche d'épaisseur d entre la cathode et la solution, cette couche étant liée au mouvement de la cathode, c'est à dire que plus le mouvement cathode-solution est intense, plus la couche de diffusion est mince et plus le transport par diffusion - donc le courant d'électrolyse - est grand. Surface de la cathode plus importante et couche de diffusion plus mince expliquent, comme le signalent KOLTHOFF et OKINAKA (14, 48) la sensibilité plus grande des cathodes de mercure tournantes dont nous parlerons très sommairement plus loin.

Le tableau ci-après, que nous empruntons à CHARLOT et Coll. (13) nous semble résumer parfaitement les possibilités respectives des différentes électrodes utilisées jusqu'ici en Polarographie dans l'échelle de la sensibilité.

	Aire(cm2)	d (μ)
Electrode de platine tournante 600 tours/minute	0,2	3
Electrode de platine fixe et agitation de la solution	0,2	250 à 500
Electrode à gouttes de mercure	0,02	40 à 60
Electrode tournante à gouttes de mercure	0,08	10 à 15
Electrode de mercure tournante	1,0	10

TABLEAU 1

Tableau comparatif des surfaces (moyennes) et des épaisseurs d (moyennes) pour quelques électrodes

33213. L'existence de maxima sur les courbes i=f(E)

Les courbes potentiel-intensité obtenues avec les électrodes à gouttes de mercure présentent très souvent de notables anomalies désignées sous le nom de maxima polarographiques : le courant atteint des valeurs supérieures au courant limite de diffusion puis revient à une valeur normale. Différentes théories ont été proposées pour interpréter ces maxima, en particulier par HEYROVSKY et ILKOVIC, ANTIVELER et VON STACKELBERG, cités par KOLTHOFF et LINGANE (46). Une interprétation récente a été donnée par CHARLOT et Coll. (13) selon laquelle les maxima seraient dûs à des mouvements tangentiels à la surface de la goutte, alors que le courant de diffusion serait dû au transport des espèces électroactives perpendiculairement à l'interface mercure-solution (diffusion sphérique.

La présence de ces anomalies dans les polarogrammes est sou-

vent extrêmement gênante, car il est impossible en leur présence de mesurer avec précision le potentiel de demi-vague. La hauteur d'un maximum dépendra de différents facteurs (34), entre autres de la durée de vie d'une goutte,de la concentration de la substance réductible et de l'électrolyte de base. De nombreux travaux ont été effectués pour tenter d'éliminer ces maxima. On y parvient (66a, 86, 87) par addition,au milieu,de substances aussi variées que des protéines (gélatine), des agents tensio-actifs (dodecylsulfonate de sodium, laurate de sodium) et même des colorants (bleu de méthylène, fuchsine). L'emploi de ces "inhibiteurs de maximum" est cependant délicat et l'on ne peut pas, sans une étude préalable, les substituer les uns aux autres. En outre ils doivent être utilisés à une concentration optimum bien déterminée, car, différents auteurs tels WIESNER (94) et KEILIN (42) ont signalé leur influence inhibitrice sur le courant de diffusion.
Dans une étude récente, BADINAND et BOUCHERLE (4) ont étudié l'emploi des polyéthylèneglycols (P.E.G.) comme suppresseurs de maximum et ont observé qu'il existait une relation simple entre l'activité inhibitrice et la concentration en P.E.G.. Cette propriété est utilisable pour l'analyse des P.E.G.

3322. Autres types d'électrodes

Si l'on considère la Polarographie comme une électrolyse entre une microélectrode polarisable et une macroélectrode non polarisable, on peut, en effet, envisager le remplacement de l'électrode à gouttes de mercure par d'autres électrodes qui pouront être soit des électrodes solides, soit des électrodes de mercure.

33221. Electrodes solides

Ces électrodes présentent dans une certaine zône de potentiels (positifs ou faiblement négatifs) un certain nombre d'avantages sur les électrodes à gouttes de mercure. Néanmoins, nous nous contenterons seulement de les signaler et de renvoyer le lecteur aux articles très complets de HUME (36). Il ne semble pas, en effet, qu'elles puissent présenter grand intérêt dans le problème que nous nous proposions de résoudre, puisque, comme nous le verrons plus loin, les colorants étudiés présentent des vagues cathodiques et non des vagues anodiques.

Nous citerons cependant les travaux de différents auteurs (17, 64) qui ont tenté de combiner les avantages des électrodes solides et des électrodes de mercure en utilisant des électrodes solides amalgamées.

33222. Electrodes de mercure

Le remplacement d'une électrode à gouttes de mercure par d'autres électrodes de mercure peut être très intéressant comme le montre l'examen du tableau 1, car il est susceptible d'améliorer considérablement la sensibilité de la méthode, tout en conservant les avantages de l'électrode à gouttes de mercure. Il a suscité de très nombreux travaux (36). Nous citerons entre autres ceux de LEE (58) sur l'électrode de mercure tournante et ceux de STRICKS et KOLTHOFF (83), TANAKA et Coll. (88) sur l'électrode tournante à gouttes de mercure.
Par ailleurs, certains auteurs (3, 71, 73, 82) ont essayé d'accroître la sensibilité de la méthode en augmentant la surface de l'électrode, puisque l'on sait que la faible sensibilité de l'électrode à gouttes de mercure est due en partie à la petite surface de la goutte.

34. ELIMINATION DE L'OXYGENE DISSOUS

L'oxygène est réductible à l'électrode à gouttes de mercure et le polarogramme de cette réduction montre deux vagues : la première ($E_{1/2}$ = - 0,1 Volt) correspond à la réduction de O_2 en H_2O_2 et la deuxième très étalée ($E_{1/2}$ vers -0,9 Volt) représente la réduction de H_2O_2 en H_2O. Or, de nombreuses réductions polarographiques se faisant dans cette zône de potentiels, il est indispensable d'éliminer, tout au moins en grande partie, l'oxygène dissous des solutions que l'on veut polarographier, surtout si l'on travaille à grande sensibilité. Nous avons vu, en effet, que l'oxygène dissous non éliminé était l'une des principales causes du courant résiduel. Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour réaliser cette très importante opération préliminaire. Le plus courant d'entre eux consiste à faire barboter pendant une dizaine de minutes un gaz inerte (en général l'azote) dans le liquide à polarographier. De nombreuses cellules spéciales ont été décrites (50, 66c), mais il est tout aussi simple d'utiliser, comme nous l'avons fait, une cellule ordinaire et de faire arriver l'azote par un capillaire de verre ou de polythène (diamètre = 0,5 mm). Avant l'essai, on fait plonger ce tube dans le liquide à polarographier pour que le barbotage d'azote en chasse l'oxygène dissous. Pendant la mesure, on relève le capillaire tout en maintenant le courant d'azote, afin d'assurer, au dessus du liquide, l'entretien d'une atmosphère inerte. L'ennui de ce procédé est qu'il est assez long et nécessite une constance rigoureuse du temps de barbotage si l'on veut faire de la polarographie quantitative.

D'autres procédés ont été proposés. C'est ainsi que si le pH de la solution à polarographier est alcalin, on peut éliminer l'oxygène dissous d'une manière extrêmement commode et rapide par l'addition d'une quantité déterminée et fixe de sulfite de sodium. La reproductibilité des résultats est excellente.

Nous signalerons aussi, à titre indicatif, un procédé d'élimination enzymatique de l'oxygène (5) par action de la glucose-oxydase et de catalase sur du glucose dans des conditions de pH déterminées.

4. CONDITIONS OPERATOIRES

41. LES SOLUTIONS POLAROGRAPHIQUES

411. Solution complémentaire

Solution tampon biphtalate de potassium - Soude (produits R.P. Prolabo) de pH 5 préparée selon CLARK et LUBS (62). Ce tampon a été définitivement adopté après de nombreux essais, où nous avons fait usage de différents tampons, plus particulièrement celui de BRITTON et ROBINSON de pH 7.

Pour contrôler les indications qui nous étaient fournies par certaines références bibliographiques, quelques tentatives ont été également faites avec un tampon de BRITTON et ROBINSON contenant 50 p. 100 d'éthanol (Volume/Volume), mais aucune amélioration dans l'enregistrement du tracé n'est venue justifier cette modification. Nous verrons ultérieurement, que cette discordance apparente entre nos essais et ceux de nos prédécesseurs tient en fait à la différence de concentration du colorant.

412. Solution de colorant

4121. Les colorants

Nos essais qualitatifs ont souvent été limités par les difficultés rencontrées pour nous procurer certains colorants. *

L'origine et la structure des colorants étudiés sont indiquées à la fin de ce travail. Leur constitution chimique a été considérée comme conforme au Colour Index (16), ou - s'ils ne figurent pas dans cet ouvrage - comme conforme à celle indiquée dans l'Index MERCK 1960. En raison de leur nombre et de leur diversité, il ne nous a pas été possible de contrôler systématiquement la pureté de tous les colorants étudiés, comme il aurait été opportun de le faire. Néanmoins, il faut signaler que les colorants utilisés étaient des colorants vendus comme "purs" et destinés le plus souvent aux usages médico-pharmaceutiques.

Enfin, nos essais de polarographie quantitative ont été réalisés sur des colorants dont le comportement chromatographique, étudié avec deux systèmes différents était celui de produits "purs".

Dans certains cas particuliers que nous aurons l'occasion de signaler, des essais de purification ont été tentés.

41211. Contrôle chromatographique de la pureté des colorants

Le premier système chromatographique employé a déjà été utilisé par DREVON et Coll. (25) pour le fractionnement des dérivés de la fluorescéine et par LAUR (52) pour l'identifi -

---

* Nous désirons à ce propos remercier la firme CIBA qui nous a fourni quelques uns des colorants étudiés.
Nous remercions également les Usines RHÔNE-POULENC qui ont bien voulu nous procurer plusieurs des colorants que nous désirions étudier.

cation de colorants alimentaires.
Les conditions de la chromatographie sont les suivantes :

- Chromatographie ascendante sur papier ARCHES 302.
- Solvant : n butanol 10 vol,
  alcool à 95° 5 vol,
  Ammoniaque 2 vol,
  Eau distillée 5 vol.
- Durée de la migration : 24 heures environ .
- Après migration, les bandes sont examinées à la lumière du jour et en lumière de Wood.

. Le deuxième système chromatographique utilisé a été préconisé par THALER et SOMMER (89) pour l'identification d'un grand nombre de colorants.
Les conditions adoptées sont les suivantes :

- chromatographie ascendante sur papier SCHLEICHER et SHULL n° 2043 a.
- solvant : citrate de sodium 10g ,
  ammoniaque 25ml,
  Eau distillée quantité suffisante pour 500ml.

Nous n'avons pas la prétention, après quelques essais de chromatographie sur papier, de tirer des conclusions définitives. Néanmoins nous pouvons dire que le second système nous a fourni de médiocres résultats, alors que le premier nous a permis de constater que l'un des colorants étudiés (bleu de méthylène) n'était pas homogène et devait être purifié. Le même essai, recommencé sur un échantillon de bleu de méthylène de marque différente vendu comme "chimiquement pur" a fourni un résultat identique.

41212. Essai de purification de colorants

Nous avons utilisé la méthode décrite par KAYE et STONEHILL (41c). Le colorant en solution aqueuse concentrée est précipité par addition de chlorure de sodium. Le précipité

recueilli (colorant + chlorure de sodium) est soigneusement séché à 70° puis agité à plusieurs reprises avec de l'alcool absolu. Après centrifugation le surnageant (solution alcoolique du colorant) est décanté et le solvant évaporé. Le résidu sec correspond au colorant "purifié". Ce procédé a été appliqué avec succès à la purification du Bleu Capri dont le comportement chromatographique était celui d'un produit homogène, mais dont le comportement polarographique - qualitativement normal - était quantitativement différent de celui attendu, ce qui laissait supposer la présence d'une impureté minérale. Par contre, le même procédé n'a pas modifié le comportement chromatographique du Bleu de méthylène. Comme ce colorant, vendu comme "chimiquement pur" présentait un comportement polarographique qualitativement homogène et quantitativement conforme à celui décrit dans la bibliographie, nous avons abandonné ces essais de purification, nous réservant de réaliser ultérieurement l'isolement et l'élution des spots du chromatogramme, puis la polarographie des différentes fractions récupérées.

4122. Le solvant

D'une manière générale, les colorants ont été mis en solution méthanolique concentrée, tout au moins dans la série de nos essais qualitatifs, 0,1ml de solution renfermant 50 à 100 µg de colorant. Pour nos essais de polarographie quantitative la solution concentrée était diluée à volume déterminé avec la solution complémentaire elle-même. Par dilution variable de cette solution avec la solution complémentaire nous avons pu ainsi étudier l'influence de la concentration sur la hauteur de la vague polarographique.

413. Solution à polarographier

- Solution de colorant (correspondant en général à environ 50 µg de colorant)
- Solution complémentaire : quantité suffisante pour 5 ml.

L'addition d'une substance supprimant les maxima, par exemple le "Carbowax" ou polyéthylène glycol 200 préconisé par BADINAND et BOUCHERLE (4), n'est pas indispensable ici, d'autant que certains des colorants étudiés ont, par eux-mêmes, une action anti-maximale déjà signalée. Il convient de préciser que l'introduction de Carbowax ne modifie en rien les potentiels de demi-vague, ce qui n'est pas le cas de tous les inhibiteurs de maximum, ainsi que le signalent BREYER et Coll. (11).
La température de la cellule polarographique a été maintenue à 25°C ± 0,2.

414. Elimination de l'oxygène dissous

Pour des raisons que nous avons développées antérieurement, cette phase de la manipulation est indispensable si l'on travaille à grande sensibilité et si l'on veut faire de la polarographie quantitative. Au cours de nos essais, l'oxygène dissous a été chassé par un barbotage d'azote (bulle à bulle rapide) de 7 minutes, l'azote étant purifié au préalable par passage dans une solution alcaline de pyrogallol (33)

42. APPAREILLAGE POLAROGRAPHIQUE

421. Les électrodes

- Cathode : électrode à gouttes de mercure
  . Hauteur de la colonne mercurielle : 55cm env.
  . Temps de formation d'une goutte : 4 sec. env.
- Anode : électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (S.C.E.)
  potentiel de cette électrode par rapport à l'électrode à hydrogène : + 0,246 Volt.

422. Le polarographe

- Polarographe A.C.I.P. système Du Bellay à inscription manuelle.
- Etalement des potentiels : 0,25 V/dm
- Sensibilité du galvanomètre : 1,6 x 10^{-9} ampère pour un déplacement du spot de 1mm.

423. Entretien de l'appareillage

4231. Electrode à gouttes de mercure

Le nettoyage de l'électrode à gouttes de mercure est important et doit être fait soigneusement. Une méthode qui nous a toujours donné satisfaction consiste à remplacer en fin de manipulation la cellule polarographique par un tube contenant de l'acide nitrique concentré. On laisse le mercure s'écouler pendant quelques instants, puis après rinçage abondant à l'eau bidistillée, on sèche l'extérieur du capillaire avec du papier filtre, on introduit le capillaire dans une petite éprouvette et l'on abaisse le réservoir de mercure. Pour ralentir à volonté la vitesse d'écoulement du mercure, de nombreux manipulateurs se contentent de placer une pince de Mohr sur le tuyau reliant le réservoir au capillaire. D'autres placent un robinet entre l'électrode et le réservoir. Le résultat est le même.

4232. Polarographe

La tension aux bornes de la cellule polarographique du polarographe Du Bellay est fixée par le déplacement manuel du curseur d'un potentiomètre. Le contact entre le curseur et le potentiomètre doit être absolument parfait, ce qui exige un nettoyage quotidien très soigneux à l'aide de papier verré et de papier filtre.

43. TECHNIQUES UTILISEES POUR DETERMINER LE COMPORTEMENT POLAROGRAPHIQUE

431. Polarographie qualitative

Les potentiels de demi-vague des composés étudiés ont été déterminés par la classique méthode des trois tangentes. D'une manière générale, ils se sont montrés constants, mais, néanmoins, nous avons pu constater que certains facteurs (température, concentration) les faisaient légèrement varier. Aussi, il sera donc toujours nécessaire - et nous insistons spécialement sur ce point - d'opérer en présence d'étalons car il est alors bien plus commode de repérer sans risque d'erreurs la position des différentes vagues.

432. Polarographie quantitative

De nombreuses méthodes, décrites dans tous les ouvrages généraux, peuvent être utilisées pour apprécier la hauteur des vagues. Cette détermination est très délicate lorsque les représentations graphiques du courant résiduel et du courant de diffusion ne sont pas parallèles. La précision des mesures décroît alors rapidement comme le signale DOMANGE (22).

La méthode qui nous a donné les résultats les plus satisfaisants et les plus constants consiste à repérer deux potentiels déterminés, l'un avant et l'autre après la vague, à tracer par ces points deux verticales sur le polarogramme et à mesurer la différence de cote des deux points d'intersection verticales - vague polarographique. Si on a pris soin de faire un essai témoin avec la solution complémentaire seule, il suffit de retrancher la différence de cote trouvée pour le témoin (courant résiduel) de celle trouvée pour l'essai : la différence est proportionnelle à la quantité de substance réductible présente.

5. POLAROGRAPHIE DE QUELQUES COLORANTS BASIQUES

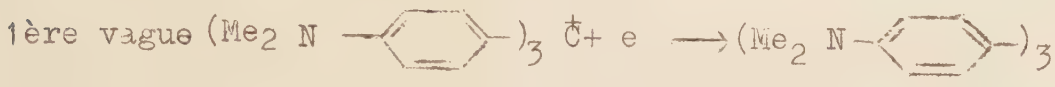
Dans chaque série chimique envisagée, divers colorants ont été étudiés qualitativement et un colorant au moins a été étudié quantitativement. Nous avons aussi essayé de déterminer la concentration minimum de colorant décelable dans les conditions opératoires précédemment décrites, sans chercher à savoir jusqu'à quelle concentration il y avait proportionnalité entre la quantité de colorant présente et la hauteur de la vague obtenue. En effet, pour de fortes concentrations, la hauteur des vagues devient délicate à mesurer; il est alors nécessaire de modifier les conditions de sensibilité de l'enregistrement, ce qui risque d'introduire une cause d'erreur supplémentaire. En outre, nous avions en vue le dosage de quantités de l'ordre du microgramme et l'étude du dosage de solutions plus concentrées n'avait pas pour nous le même intérêt.

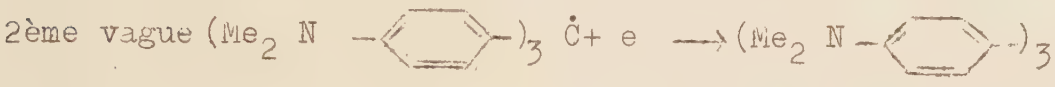
51. POLAROGRAPHIE DE COLORANTS BASIQUES DERIVES DU DI- ET DU TRIPHENYLMETHANE

KAYE et STONEHILL (41b) ont étudié d'une manière très complète la réduction polarographique de ces dérivés. Selon eux, ces colorants, à une concentration de l'ordre de 4×10^{-4}M, sont réductibles en solution aqueuse à l'électrode à gouttes de mercure, mais fournissent des polarogrammes déformés par l'adsorption du colorant sur la goutte elle-même. Ces effets d'adsorption peuvent être éliminés par introduction de 50 p. 100 (volume/volume) d'éthanol dans la solution de base; les polarogrammes obtenus sont alors de forme normale et montrent une vague de réduction à deux étages.

Le mécanisme de la réduction polarographique de ces dérivés a également été étudié en fonction du pH. Chaque vague correspond à la mise en jeu de un électron et le premier stade de la réduc-

tion conduit à la formation d'une semiquinone très stable. A pH 5, le mécanisme de réduction polarographique du violet cristallisé peut être représenté par les schémas suivants :

1ère vague 

2ème vague 

Ce schéma réactionnel est également valable pour les autres dérivés du triphénylméthane. Il faut cependant signaler le comportement légèrement différent de l'auramine O (dérivé du diphénylméthane). Alors que la réduction polarographique des dérivés du triphénylméthane s'effectue avec formation intermédiaire d'une semiquinone, quel que soit le pH, l'auramine à pH inférieur à 5,3 est réduite en une seule vague à deux électrons. Notons d'ailleurs, avec KAYE et STONEHILL, qu'aux pH acides la vague de réduction de l'auramine est immédiatement suivie d'une vague catalytique hydrogène.

511. Analyse qualitative

Le tableau ci-après (tableau 2) résume les résultats obtenus avec quelques colorants basiques de cette série pris à titre d'exemples. Un seul potentiel de demi-vague est indiqué, car, dans les conditions opératoires (pH, sensibilité, concentration) ou nous nous sommes placés, une seule vague est nettement observable. Aux faibles concentrations étudiées (2×10^{-5} M), les vagues apparaissent sans anomalies, alors qu'à des concentrations plus fortes, on obtient des vagues déformées, ainsi que le signalent différents auteurs.

Colorant	E 1/2(en volts vs S.C.E.)*
Auramine O	- 1,03
Fuchsine	- 0,79
Parafuchsine	- 0,79
Violet hexaméthylé	- 0,78
Vert malachite	- 0,71
Vert de méthyle	- 0,66

* vs S.C.E. (abbréviation de : versus saturated calomel electrode) peut se traduire par : rapportée au potentiel de l'électrode à calomel

TABLEAU 2

Polarographie de colorants basiques dérivés du di- et du triphénylméthane en tampon de CLARK et LUBS à pH 5

L'analyse qualitative d'un mélange de colorants de cette série a été également envisagée. Les figures 5 et 6 représentent les polarogrammes d'un mélange contenant vert malachite - violet cristallisé - auramine O et ont été respectivement obtenus avec le polarographe Du Bellay (polarographie classique) et avec le polarographe Radiometer (polarographie dérivée). La figure 10 représente la polarographie dérivée d'un mélange vert malachite-vert de méthyle : ces deux composés apparaissent séparés alors que la polarographie classique ne permet pas de les distinguer nettement.

512. Analyse quantitative

5121. Vert malachite

La hauteur des vagues polarographiques obtenues s'est montrée proportionnelle à la concentration du colorant pour des

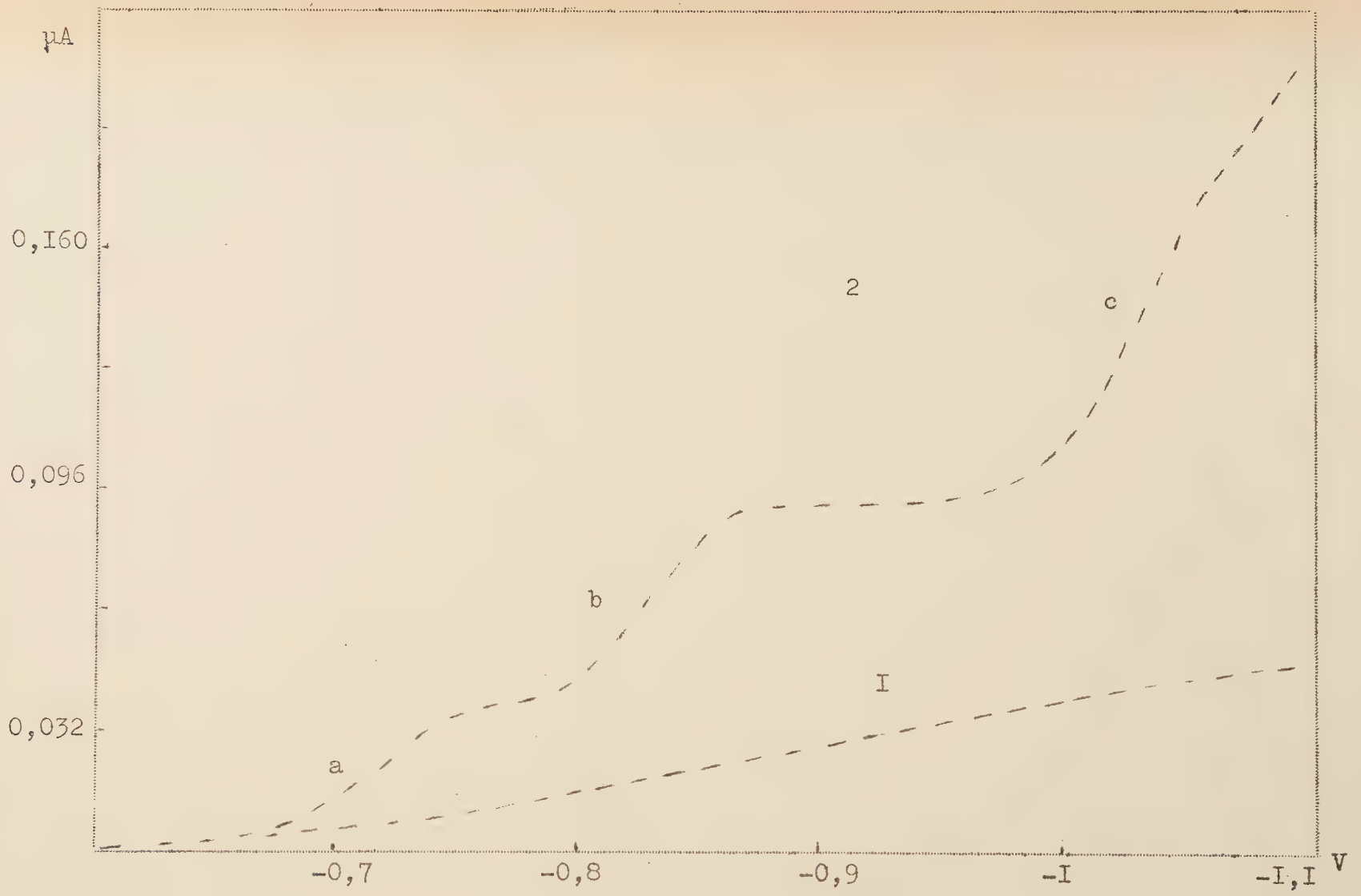


Fig. 5.

Polarographie d'un mélange de colorants

I tampon seul (avec compensation)

2 tampon + Vert malachite (a) + Violet cristallisé (b) + Auramine O (c)

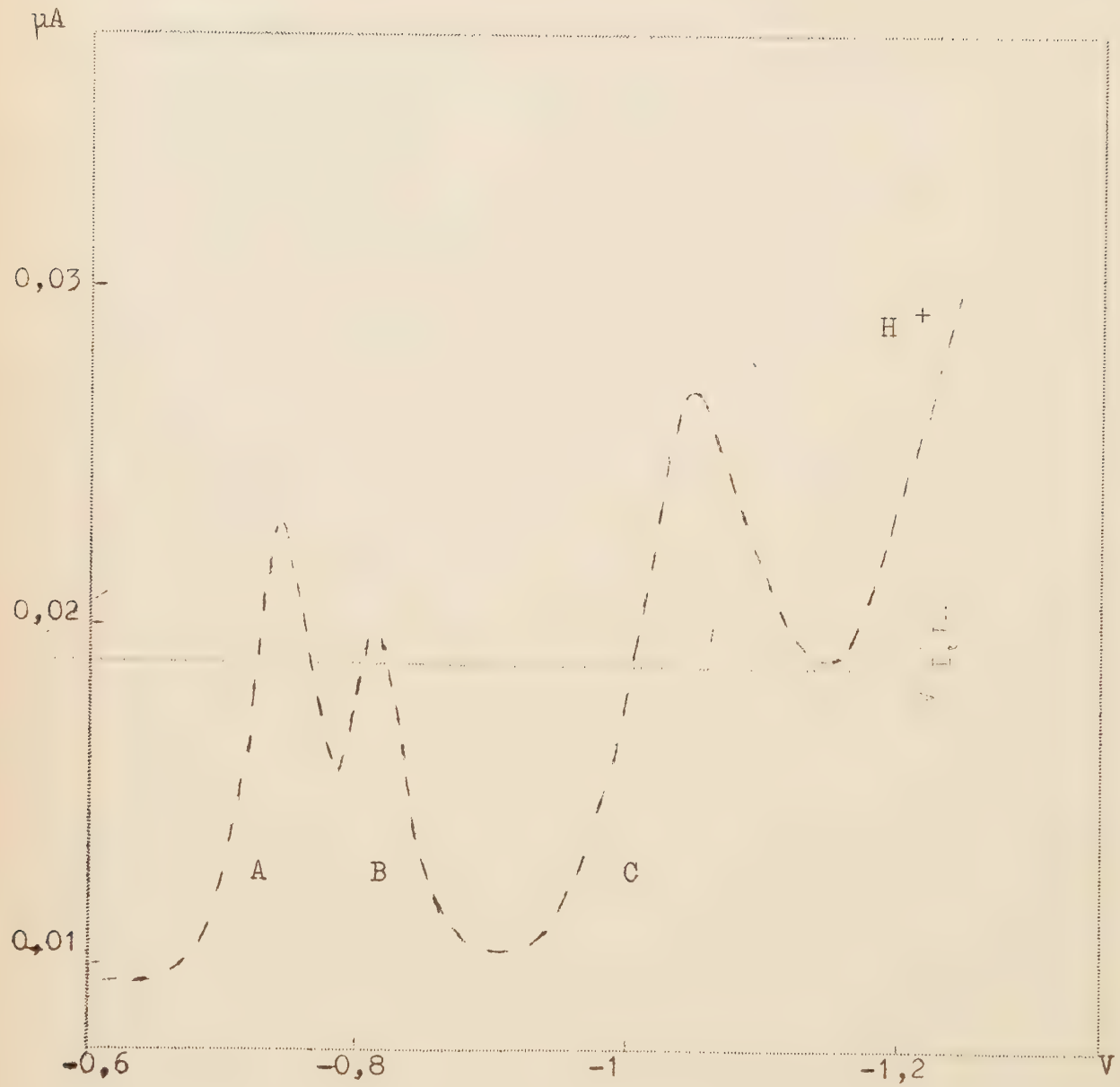


Fig. 6

Polarographie dérivée d'un mélange de colorants

A = Vert malachite

B = Violet hexaméthylé

C = Auramine O

concentrations allant de 20 à 100 µg dans 5ml de solution (1,09 à 5,4 x 10-5M). Des vagues nettes et faciles à apprécier ont été obtenues. Le tableau 3 et la courbe 1 illustrent les résultats obtenus.

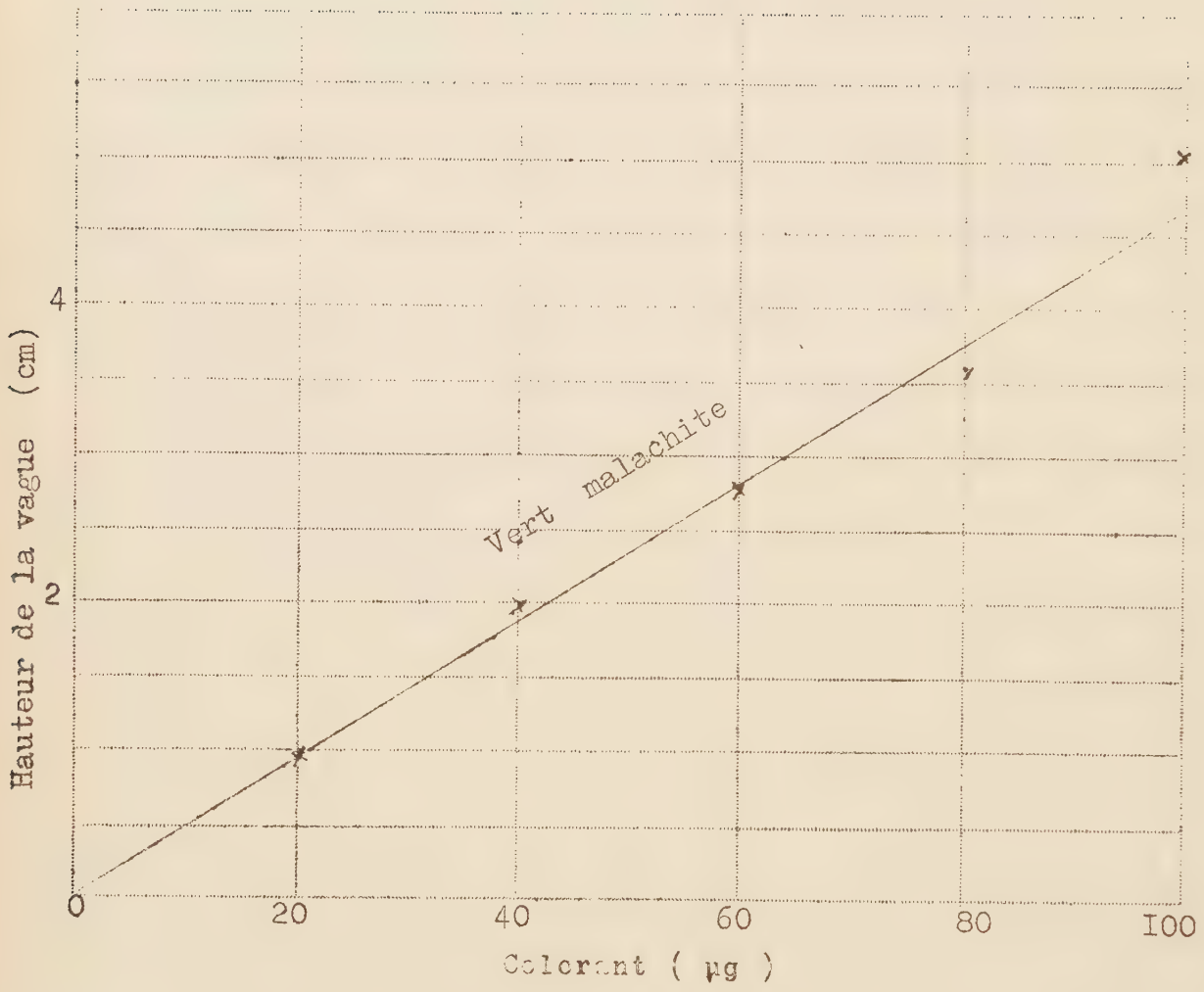
Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité trouvée en µg	Erreur en %
20	1,1	20,5	2,5
40	2	37	7,5
60	3,3	60	0
80	4,1	75	6,2
100	6	108	8

TABLEAU 3

Dosage polarographique du vert malachite

5122. Auramine O

A quantité de colorant égale, la hauteur des vagues est beaucoup plus importante avec l'auramine O qu'avec un dérivé du triphénylméthane, ce qui confirme les hypothèses de KAYE et STONEHILL (une seule vague de réduction pour l'auramine O au pH utilisé alors que la réduction se fait en deux vagues pour les dérivés du triphénylméthane, la deuxième vague étant d'ailleurs masquée par la vague catalytique hydrogène ainsi qu'il a été dit précédemment). La hauteur des vagues polarographiques obtenues s'est montrée proportionnelle à la concentration du colorant pour des concentrations allant de 9,6 à 48 µg dans 5ml de solution (0,6 à 2,9 x 10-5M).
Le tableau 4 et la courbe 2 illustrent les résultats obtenus.

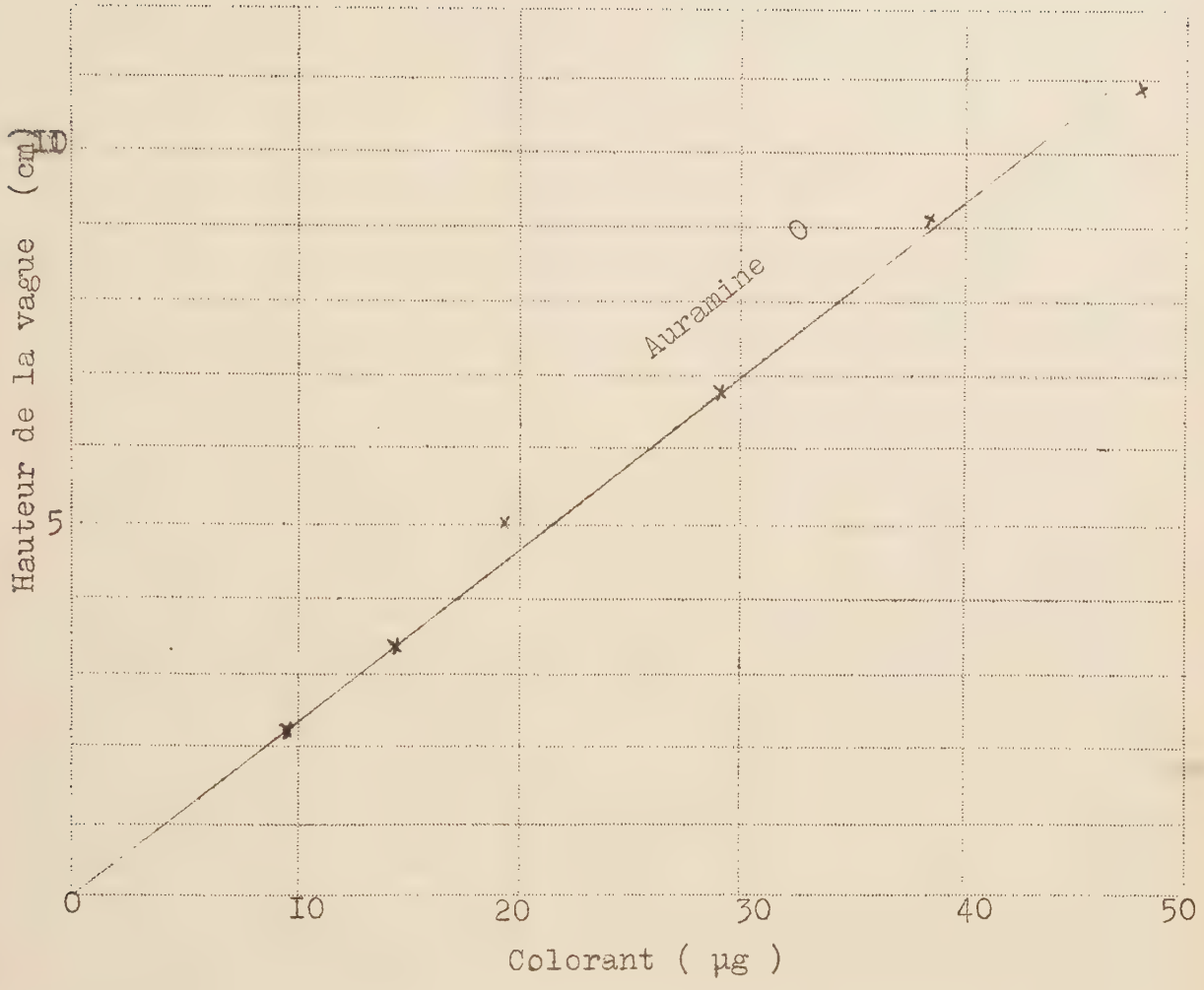


Courbe I .

Dosage polarographique du vert malachite

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm



Courbe 2.

Dosage polarographique de l' Auramine O

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm

Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité trouvée en µg	Erreur en %
9,6	2,25	9,6	0
14,4	3,40	14,4	0
19,2	5,08	21,2	10,4
28,8	6,83	28,5	1
38,4	9,20	39	1,5
48	10,95	46,5	3,1

TABLEAU 4

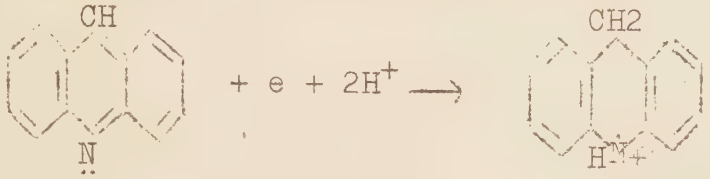
Dosage polarographique de l'auramine O

52. POLAROGRAPHIE DE COLORANTS BASIQUES DERIVES DE L'ACRIDINE

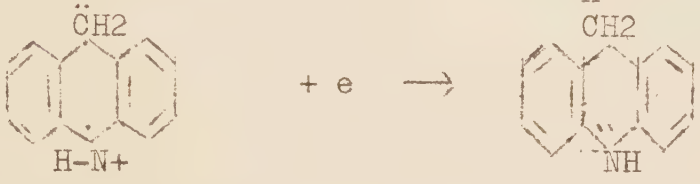
La polarographie de l'acridine et de ses dérivés a suscité depuis plusieurs années de nombreux travaux. L'un des premiers à s'intéresser à ce problème fut LINGANE (61) qui étudia le comportement polarographique de la 9-phénylacridine et de la 9-o-iodophénylacridine. Différents auteurs (11, 32, 40) ont étudié la relation entre les potentiels d'oxydo-réduction et les constantes polarographiques des dérivés de l'acridine d'une part et leur activité anti-bactérienne d'autre part.
KAYE et STONEHILL (41a) ont réalisé, pour divers pH et des concentrations de produit comprises entre 10^{-3} et 10^{-4}M une étude très détaillée sur la polarographie qualitative et quantitative de l'acridine. En accord avec les travaux antérieurs, ils trouvèrent qu'en solution aqueuse on obtient des polarogrammes anormaux tandis qu'en solution hydro alcoolique(50 p. 100 d'éthanol), ces anomalies disparaissent. Selon ces auteurs, l'obtention de vagues déformees en solution aqueuse s'expliquerait de manière satisfaisante par la théorie de BRDICKA (10a). Elle serait due

à l'adsorption de l'acridine sur l'électrode de mercure. Par contre, en opérant en milieu hydro-alcoolique, le polarogramme est normal, et, dans une zône de pH comprise entre 5 et 13, la réduction parait s'effectuer selon le schéma suivant :

1ère vague



2ème vague



521. Analyse qualitative

Au cours de nos essais, la réduction polarographique de l'acridine et de ses dérivés en tampon aqueux s'est révélée beaucoup plus aisée que ne le laissait prévoir la bibliographie, et, d'une manière générale, dans les conditions opératoires précédemment décrites, nous n'avons jamais obtenu de vagues irrégulières. Cette discordance s'explique vraisemblablement, comme dans le cas des dérivés du triphénylméthane, par la différence des concentrations étudiées. Nous avons, en effet, travaillé à de faibles concentrations (10^{-5}M). Quelques essais réalisés avec des concentrations plus fortes (supérieures à 10^{-4}M) sont venus confirmer exactement les données bibliographiques : les vagues obtenues sont alors déformées.

La réduction polarographique des dérivés de l'acridine s'effectue bien en deux vagues, mais dans les conditions polarographiques adoptées, seule la première vague apparait nettement et a été étudiée. La deuxième est souvent partiellement masquée par la vague catalytique hydrogène.

Le tableau 5 indique le potentiel de demi vague de la première vague de réduction des quelques dérivés acridiniques étudiés.

Colorant	E1/2 (en volts vs S.C.E.)
Rivanol	- 1,16
Acridine Orange R	- 1,10
Acriflavine	- 1,03
Quinacrine	- 0,97
Acridine	- 0,44

TABLEAU 5

Polarographie de colorants basiques dérivés de l'acridine en tampon de CLARK et LUBS à pH5

La séparation polarographique de plusieurs colorants de cette série en mélange a été également étudiée. La figure 8 montre l'enregistrement en polarographie classique (Polarographe Du Bellay) d'un mélange Quinacrine + Rivanol et la figure 7 représente cet enregistrement en polarographie dérivée (Polarographe . Radiometer).

522. Analyse quantitative : Quinacrine

La hauteur des vagues polarographiques obtenues s'est montrée proportionnelle à la concentration du colorant pour des concentrations de 15,3 à 102 µg dans 5ml de solution (0,6 à 4×10^{-5}M). Le tableau 6 et la courbe 3 illustrent les résultats obtenus.

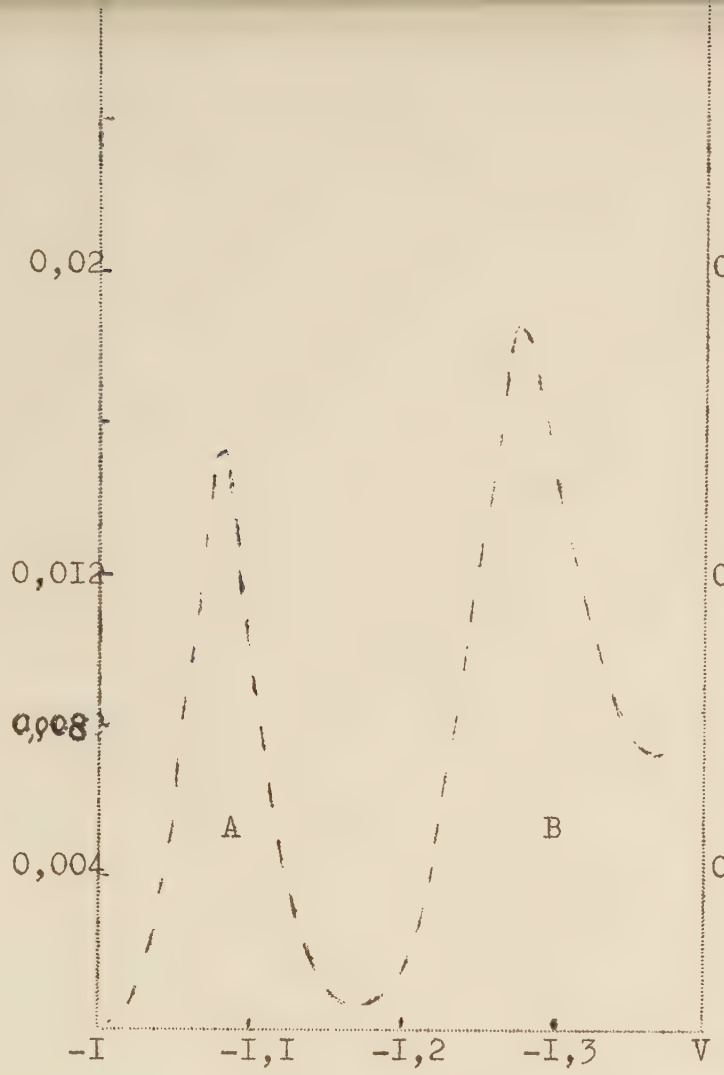


Fig. 7.
Polarographie dérivée d'un mélange de colorants :
Quinacrine (A) + Rivanol (B)

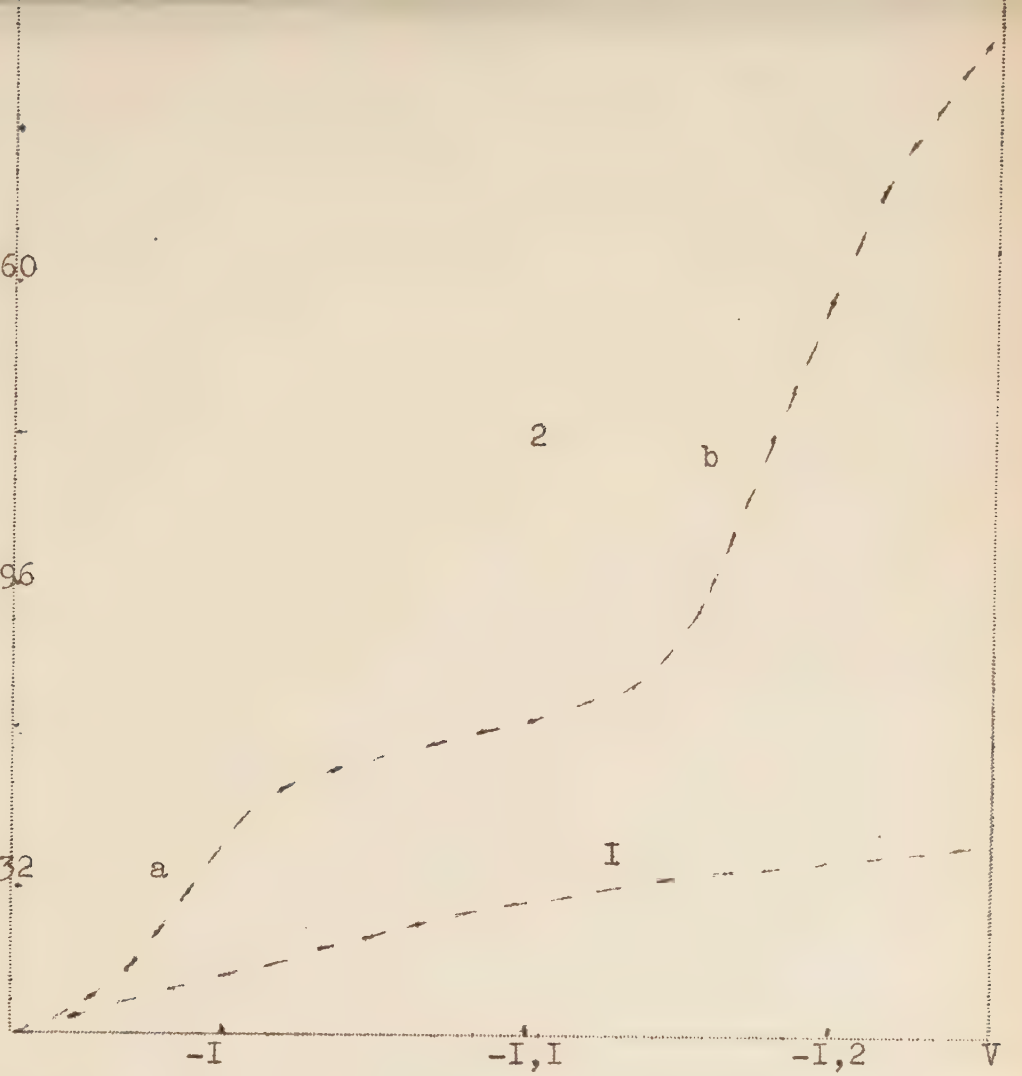
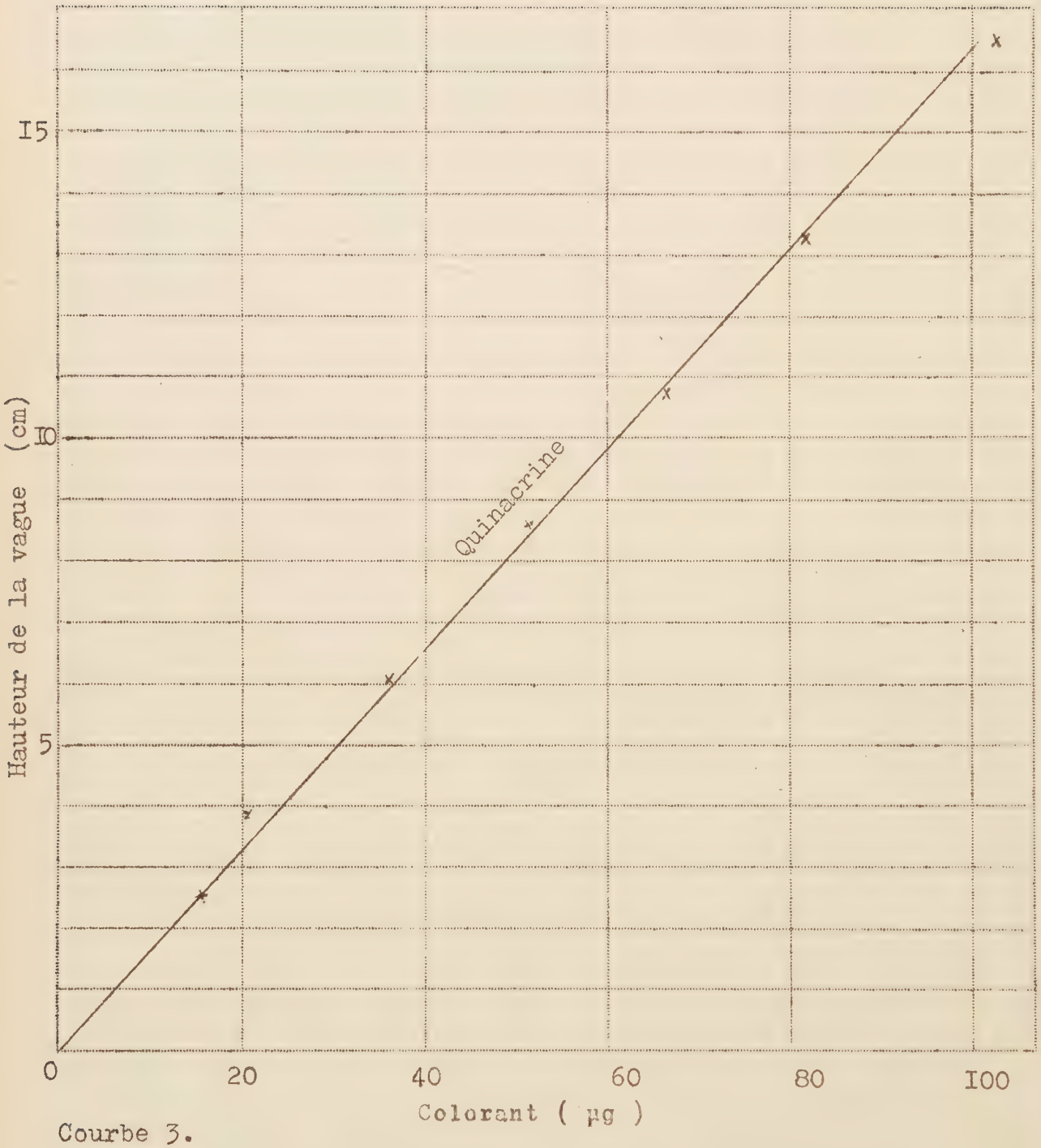


Fig. 8.
Polarographie d'un mélange de colorants
I tampon seul (avec compensation)
2 tampon + Quinacrine (a) + Rivanol (b)



Courbe 3.

Dosage polarographique de la Quinacrine

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm

Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité de trouvée en µg	Erreur en %
15,3	2,45	15	1,9
20,4	3,8	23	12,6
35,7	6	36,5	2,2
51	8,5	52	1,9
66,3	10,7	65	1,9
81,6	13,2	81	0,7
102	16,4	100	1,9

TABLEAU 6

Dosage polarographique de la Quinacrine

53. Polarographie de colorants basiques aziniques

La polarographie des azines et plus spécialement des thiazines a fait l'objet depuis longtemps déjà de multiples travaux. C'est ainsi que BRDICKA (10a, 10b), étudiant le comportement polarographique du bleu de méthylène, constata que, pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M, la vague principale était precédee d'une petite vague anormale. MULLER (70) enregistra un phénomène identique avec d'autres colorants chimiquement voisins du bleu de méthylène. Ces auteurs attribuèrent l'anomalie observée à l'adsorption du colorant sur le mercure et différents travaux sont venus confirmer cette théorie. TACHI et TSUKAMOTO (85) ont constaté, en effet, que la réduction polarographique du bleu de méthylène avec une cathode de platine tournante se passait normalement et que la vague anormale ne s'obtenait qu'avec une cathode de mercure. En outre, ils trouvèrent, comme l'avait déjà constaté BRDICKA que cette vague anormale était en grande partie supprimée par la présence d'éosine ou d'autres composés plus fortement adsorbés sur la goutte de mercure. LORENZ et SCHMALZ (63) étudièrent par la suite la cinétique de l'adsorption du bleu de méthylène a l'électrode de mercure.

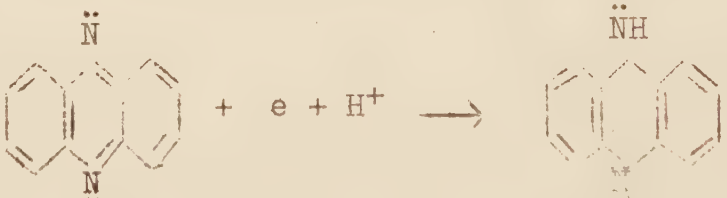
Différents travaux (37, 92) ont établi que les phénazines, les oxazines et les thiazines forment aussi des vagues catalytiques. IIZUKA (37) a observé dans le cas du bleu de méthylène une vague catalytique à environ -1,7 Volts qu'il a étudiée en fonction du pH et de la concentration.

Le mécanisme de la réduction de ces dérivés a fait également l'objet de nombreuses publications parmi lesquelles nous citerons celles de KAYE et STONEHILL (41c, 41d), de KALOUZEK et KALEK (39), de SCHWABE et BERG (80) et de MICHAELIS et Coll. (68).

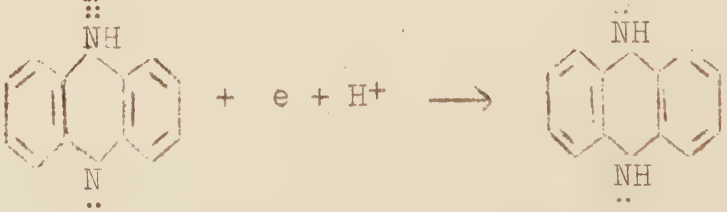
KAYE et STONEHILL ont montré que la réduction polarographique des dérivés aziniques se faisait, comme pour les colorants dérivés de l'acridine ou du triphénylméthane, selon une vague à deux étages, avec formation intermédiaire d'une semiquinone, chacune des vagues correspondant à la mise en jeu d'un électron. Toutefois, alors que la réduction des dérivés de l'acridine ou du triphénylméthane aboutit, dans un premier temps, à l'obtention d'une semiquinone très stable quel que soit le pH, la réduction des dérivés aziniques fournit une semiquinone qui n'est stable qu'aux pH fortement acides (68). Dès que le pH augmente (pH supérieur à 2), les vagues ne sont plus séparées et se confondent pour donner une seule vague à deux électrons.

C'est ainsi qu'à pH5, la réduction polarographique de la phénazine fournit une vague, mais paraît cependant se faire selon le schéma suivant :

1er stade



2ème stade



Nous signalons aussi que, selon KAYE et STONEHILL, la réduction polarographique de ces dérivés en tampon aqueux fournit une pré-vague anormale d'adsorption. Cette anomalie est supprimée par l'emploi d'un tampon contenant 50 p. 100 d'éthanol, le seul inconvénient de ce procédé étant de diminuer aussi la hauteur de la vague normale.

531. Analyse qualitative

Au cours de nos essais réalisés en milieu aqueux à de faibles concentrations (10^{-5}M), nous n'avons pas observé d'anomalies dans les tracés obtenus, de sorte que l'emploi d'un tampon à 50p. 100 d'éthanol s'est montré superflu.

Le tableau 7 indique les potentiels de demi vague de quelques colorants basiques aziniques choisis à titre d'exemple parmi les différents colorants de ce groupe.

Série	Colorant	E 1/2(en Volts vs SCE)
Amino-indamine	Bleu de toluylène*	- 0,09
Diazines	Rouge neutre	- 0,49
	Phénosafranine	- 0,46
	Mauvéine	- 0,44
Thiazines	Bleu de méthylène	- 0,11
	Thionine	- 0,09
Oxazines	Bleu Capri	- 0,18
	Bleu de Meldola	- 0,02

TABLEAU 7

Polarographie de colorants basiques aziniques en tampon de CLARK et LUBS à pH 5.

* Bleu de toluylène : ce colorant est etudié ici car il constitue un produit intermédiaire de la fabrication du rouge neutre.

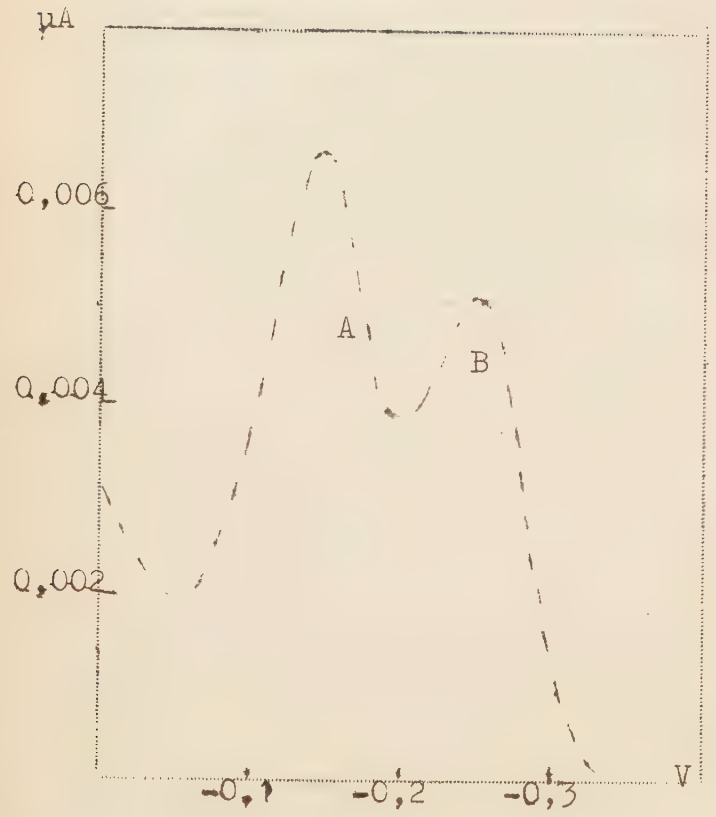


Fig. 9

Polarographie dérivée

A = Bleu de méthylène

B = Bleu Capri

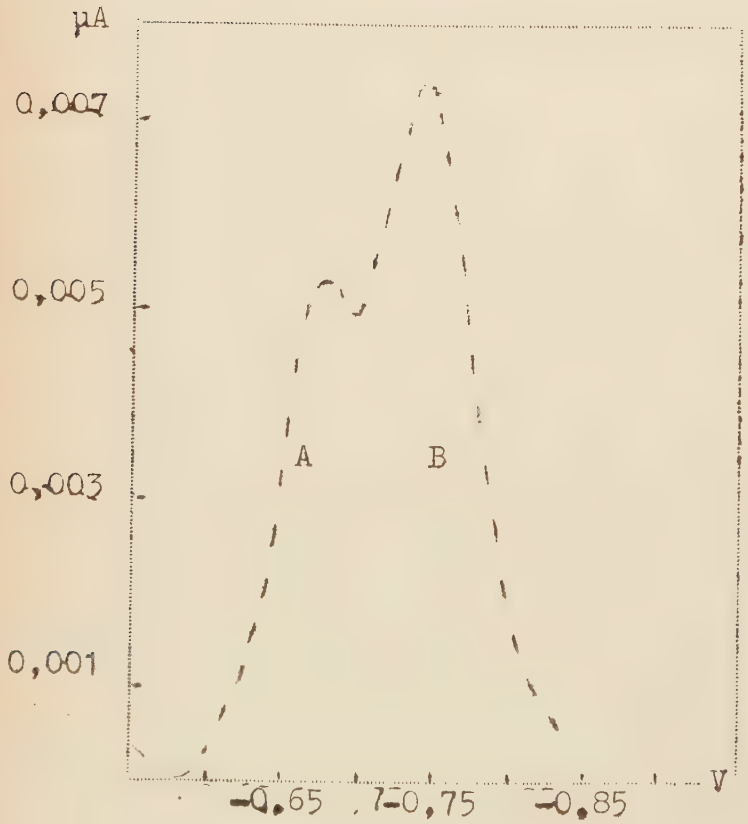


Fig. 10

Polarographie dérivée

A = Vert de méthyle

B = Vert malachite

L'analyse qualitative de mélanges de colorants de ces séries a été tentée et a pu parfois être obtenue. La figure 9 représente l'enregistrement en polarographie dérivée (Polarographe Radiometer) de la réduction d'un mélange bleu de méthylène-bleu Capri : les deux vagues apparaissent bien séparées, alors qu'elles sont difficilement repérables en polarographie classique.

532. Analyse quantitative

5321. Diazines : Rouge neutre

Les hauteurs des vagues polarographiques obtenues sont proportionnelles aux concentrations lorsque celles-ci varient de 14,5 à 97 µg dans 5ml (1 à 6,7 x 10^{-5}M). La courbe 4 et le tableau 8 illustrent les résultats obtenus.

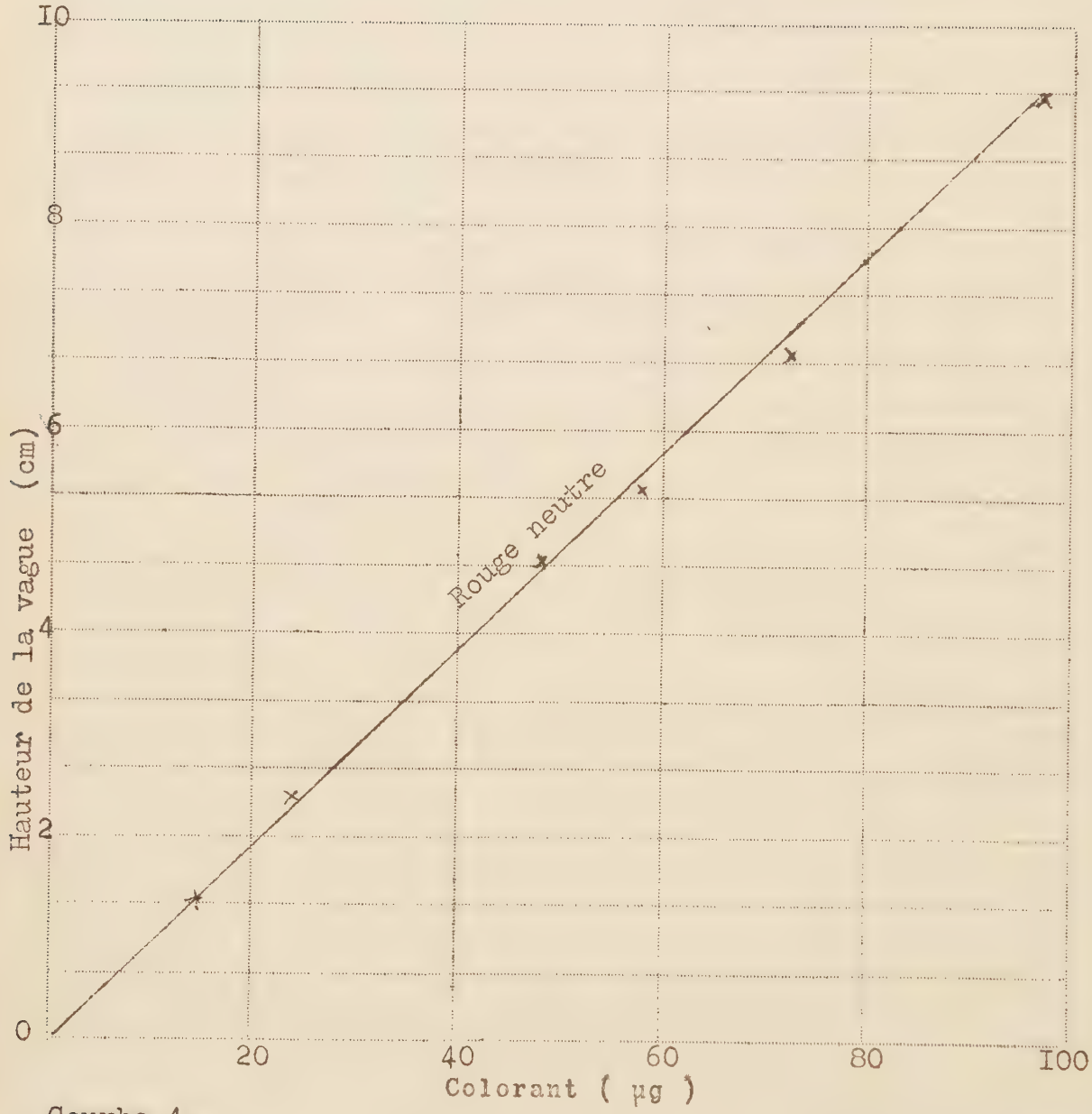
Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague (en cm)	Quantité trouvée (en µg)	Erreur en %
14,5	1,4	14,5	0
24	2,4	25	4,1
48,5	4,7	49	1
58	5,45	57	1,7
72,5	6,75	70,5	2,7
97	9,3	97,5	0,5

TABLEAU 8

Dosage polarographique du Rouge neutre

5322. Thiazines : bleu de méthylène

La polarographie quantitative des thiazines est tout particulièrement délicate, car la réduction polarographique de ces dérivés se situe à un potentiel très voisin de celui correspondant à la réduction de O_2 en H_2O_2. Il est donc indispensable d'éliminer l'oxygène dissous de manière rigoureusement identique



Courbe 4.

Dosage polarographique du Rouge neutre

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml
Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique (cm)

lors des différents essais. En outre, dans le cas de ces dérivés, on a intérêt à se servir du système de compensation du polarographe, ce qui permet d'annuler ou tout au moins de diminuer le courant résiduel. Les vagues, principalement celles correspondant à de faibles quantités de colorant, apparaitront plus nettement. La hauteur des vagues polarographiques obtenues s'est montrée proportionnelle à la concentration du colorant pour des concentrations de 13 à 78 µg dans 5ml (0,7 à 4,2 x 10^{-5}M) . Le tableau 9 et la courbe 5 illustrent les résultats obtenus.

Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité trouvée en µg	Erreur en %
13	1,3	11	15,3
26	3,1	26,2	0,9
39	4,4	37,7	3,3
52	6,35	54,5	4,8
78	9,13	78,5	0,6

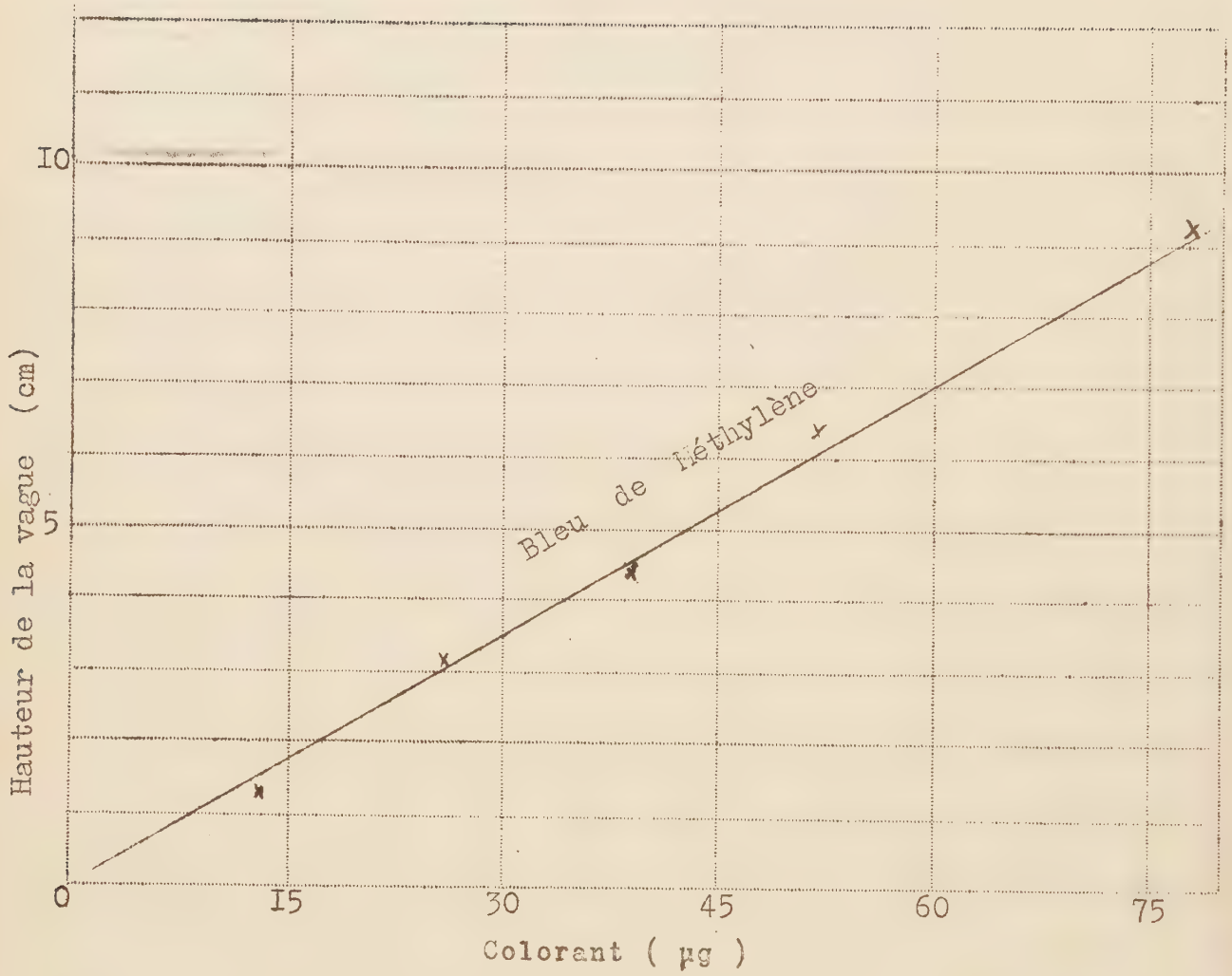
TABLEAU 9

Dosage polarographique du bleu de méthylène

5323. Oxazines : bleu Capri

La remarque que nous avons faite pour les thiazines au sujet de l'élimination de l'oxygène dissous est également valable pour les oxazines.

La polarographie du bleu Capri a été étudiée à des concentrations de 24,8 à 99,2 µg dans 5ml (1,4 à 5,7 x 10^{-5}M).



Courbe 5.

Dosage polarographique du Bleu de méthylène

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm

Le tableau 10 et la courbe 6 illustrent les résultats obtenus.

Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité trouvée en µg	Erreur en %
24,8	2,5	22,6	8,8
37,2	4,57	39,4	5,9
49,6	6,15	55,6	12
62	7,25	65,6	5,8
74,4	8,10	73,6	1
99,2	10,4	94,5	4,7

TABLEAU 10

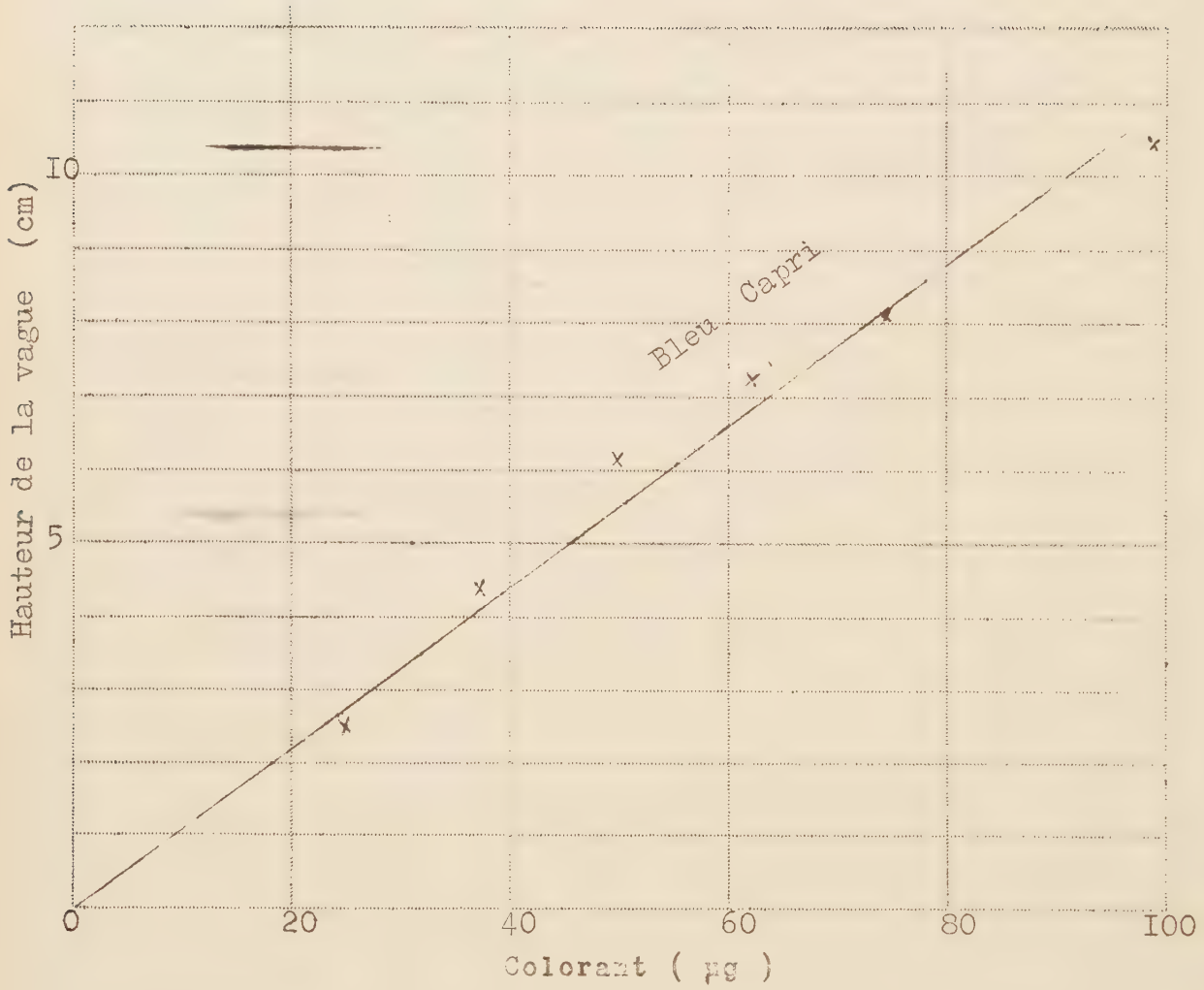
·Dosage polarographique du bleu Capri

54. POLAROGRAPHIE DE COLORANTS AZOIQUES BASIQUES

Les premiers travaux effectués sur la polarographie de dérivés azoiques remontent, comme le signalent KOLTHOFF et LINGANE (46) ou MILNER (69), à près de trente ans et furent réalisés par TACHI et Coll. (84). Ils portèrent sur l'azobenzène, et, les résultats obtenus montrèrent que, quel que soit le pH, la réduction polarographique de ce composé pouvait se traduire par le schéma suivant :

$$C_6H_5 - N = N - C_6H_5 + 2H^+ + 2e \longrightarrow C_6H_5 - NH - NH - C_6H_5$$

D'autres travaux plus récents ont été consacrés à la polarographie des azoiques. C'est ainsi que COBRAL et TURNER (15) ont utilisé cette méthode pour doser différents colorants mono ou polyazoiques et que SATO (79) a réalisé une étude du comportement polarographique de la chrysoidine .



Courbe 6.

Dosage polarographique du Bleu Capri

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5 ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm

541. Analyse qualitative

Les essais qualitatifs ont été très limités, car, initialement, cette série chimique de colorants ne s'inscrivait pas dans le cadre de notre travail. Elle a été, cependant, sommairement étudiée dans le but de compléter les résultats obtenus au cours de cette étude. Ceci explique que, du point de vue qualitatif, nos essais aient porté sur deux colorants seulement, l'un monozoique et l'autre diazoique. L'examen du tableau 11 montre d'ailleurs que ces deux colorants n'ont pas pu être identifiés séparément par la méthode polarographique.

Colorant	E 1/2 (en Volts vs SCE)
Chrysoidine R	- 0,32
Brun Bismarck	- 0,32

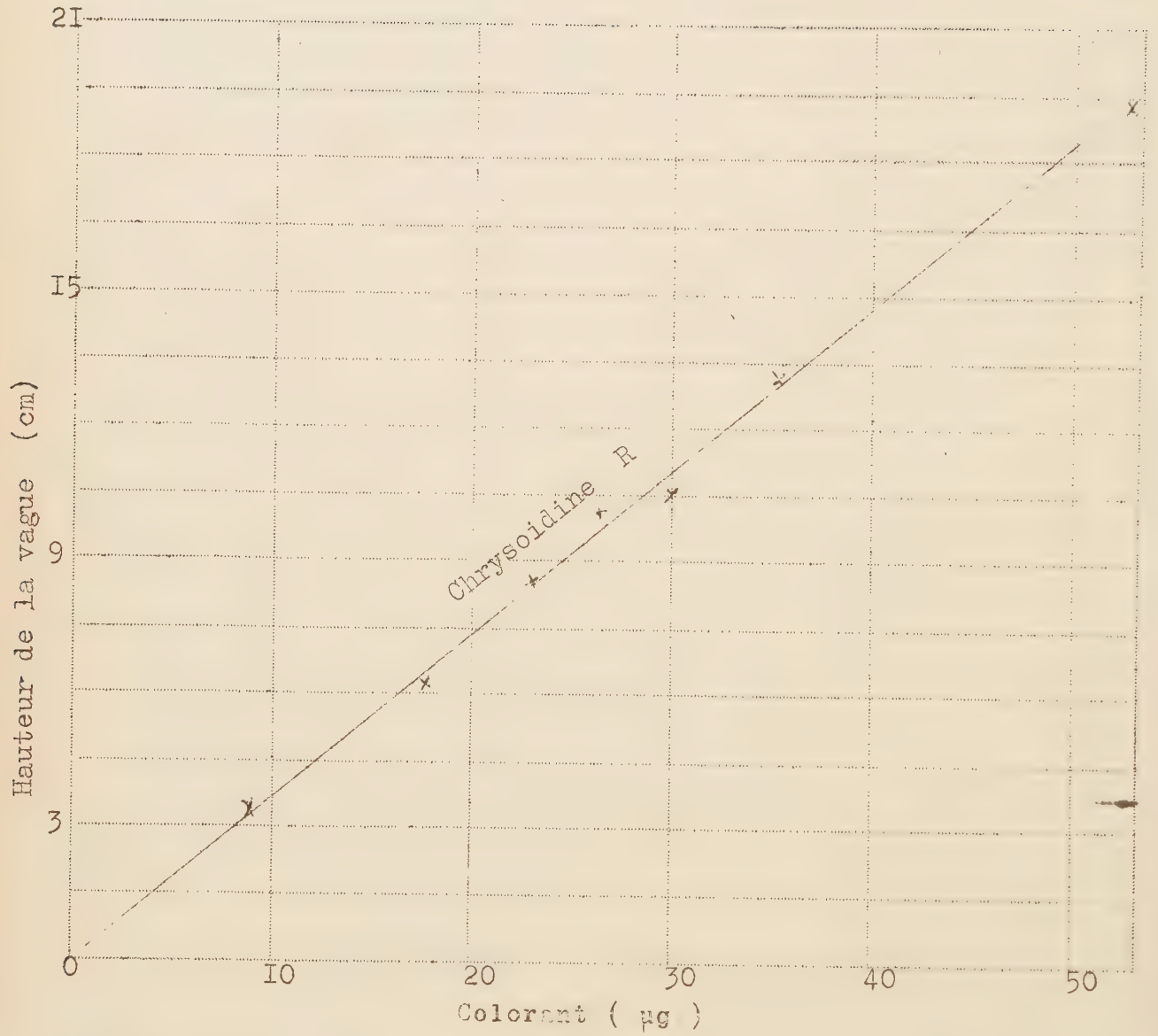
TABLEAU 11

Polarographie de colorants azoiques basiques en tampon de CLARK et LUBS pH5

542. Analyse quantitative : Chrysoidine R

La polarographie de la chrysoidine R a été étudiée par des concentrations de colorant de 8,8 à 52,8 µg dans 5 ml ($0,7$ à $4,2 \times 10^{-5}$M).

Le tableau 12 et la courbe 7 illustrent les résultats obtenus.



Courbe 7.

Dosage polarographique de la Chrysoidine R

Abscisses : Quantité de colorant en microgrammes dans 5ml

Ordonnées : Hauteur de la vague polarographique en cm

Quantité introduite en µg/5ml	Hauteur de la vague en cm	Quantité trouvée en µg	Erreur en %
8,8	3,4	9,2	4,5
17,6	6,2	16,8	4,5
22,9	8,5	22,9	0
26,4	10,2	27,5	4,2
29,9	10,5	28,3	5,3
35,2	13,1	35,5	0,8
52,8	19,3	52,3	0,9

TABLEAU 12

Dosage polarographique de la chrysoidine R

55. POLAROGRAPHIE D'UN MELANGE DE COLORANTS BASIQUES

L'étude que nous venons d'exposer sur différents colorants basiques montre que si la Polarographie est une méthode très intéressante pour sa rapidité, il n'en est pas de même pour sa sensibilité. En effet, d'autres méthodes d'analyse très simples, la colorimètrie par exemple, sont susceptibles de doser avec précision quelques microgrammes de colorant, alors que, dans les conditions où nous avons travaillé, il était en général nécessaire d'avoir au moins 20 à 25 µg de colorant. Certes - et nous l'avons indiqué au début de ce travail - des améliorations sont possibles (électrode de mercure tournante, appareillage de micropolarographie), mais il semble que l'intérêt de la Polarographie soit d'être non pas un procédé de dosage précis d'un colorant isolé et connu, mais une méthode permettant d'effectuer l'analyse qualitative d'un mélange de colorants, l'analyse quantitative simultanée n'étant toutefois pas exclue.

551. Polarographie d'un mélange de colorants basiques appartenant à la même série chimique

L'analyse qualitative d'un mélange de colorants voisins a été envisagée précédemment . Cette analyse ne pourra souvent être que partielle, comme le laisse prévoir l'examen des potentiels de demi vague. Néanmoins, l'emploi de la polarographie dérivée permettra parfois d'améliorer les résultats (fig. 10).

L'analyse quantitative d'un mélange de colorants appartenant à la même série chimique, est extrêmement délicate et nous pensons que l'on ne puisse obtenir autre chose qu'un ordre de grandeur.

552. Polarographie d'un mélange de colorants appartenant à des séries chimiques différentes

Notre étude a porté jusqu'ici sur des colorants pris à l'intérieur d'une même série chimique et étudiés soit séparément, soit en mélange. Cependant, le problème est souvent plus complexe et nous avons été amenés à envisager la séparation de mélanges de colorants chimiquement différents (colorants acides + colorants basiques).

Un premier fractionnement des colorants acides et basiques peut être fait à l'aide de la technique décrite par LAUR (52) qui utilise la propriété des colorants basiques d'être directement solubles dans le chloroforme, alors que les colorants acides ne le sont qu'après avoir été combinés avec les ammoniums quaternaires.

Après élimination de la phase chloroformique, les colorants basiques peuvent être soumis à l'identification polarographique. D'une manière générale, l'analyse qualitative d'un mélange de colorants basiques chimiquement différents est possible. Elle fournit toujours des résultats intéressants qui permettent d'affirmer l'absence ou de supposer la présence de tel ou tel colorant, mais il est indispensable d'opérer en présence d'éta-

lons afin de repérer exactement les potentiels de demi-vague des colorants en présence. Lorsque ceux-ci sont très voisins, il peut être intéressant d'utiliser la polarographie dérivée. Enfin, l'analyse quantitative d'un mélange de colorants est possible dans la mesure où les différentes vagues sont suffisamment séparées.

Deux exemples illustrent l'intérêt de la méthode polarographique. Le premier (fig. 11) correspond à la polarographie d'un mélange jaune de quinoléine - Violet hexaméthylé - Vert malachite - Trypaflavine, après élimination du jaune de quinoléine (colorant acide) par le procédé précédemment indiqué.

Le deuxième exemple (fig. 12) montre la séparation polarographique très nette d'un mélange Rouge neutre - Violet Hexaméthylé.

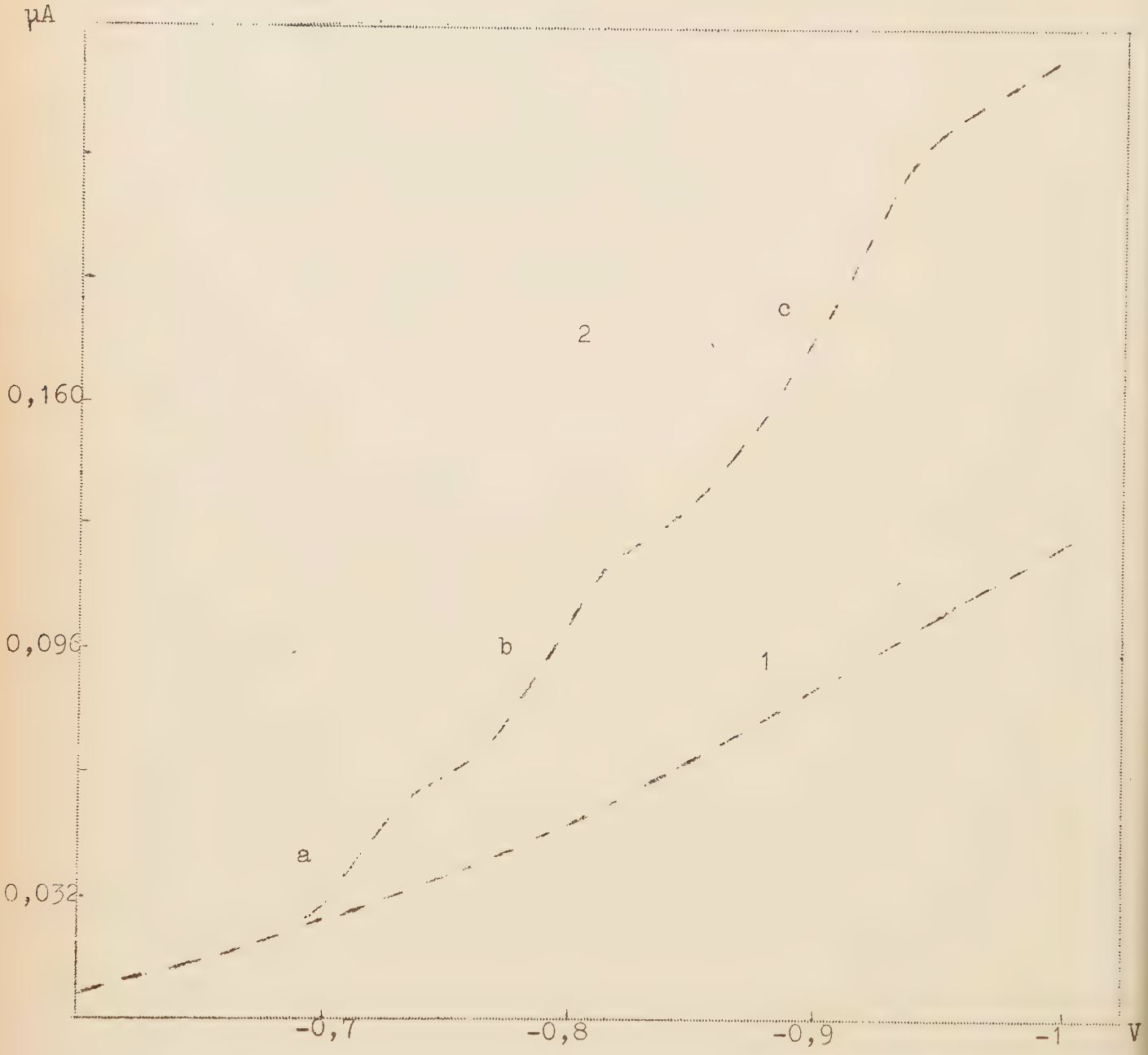


Fig. 11.

Polarographie d'un mélange de colorants

1 tampon seul (sans compensation)

2 tampon + Vert malachite (a) + Violet cristallisé (b) + Trypaflavine (c)

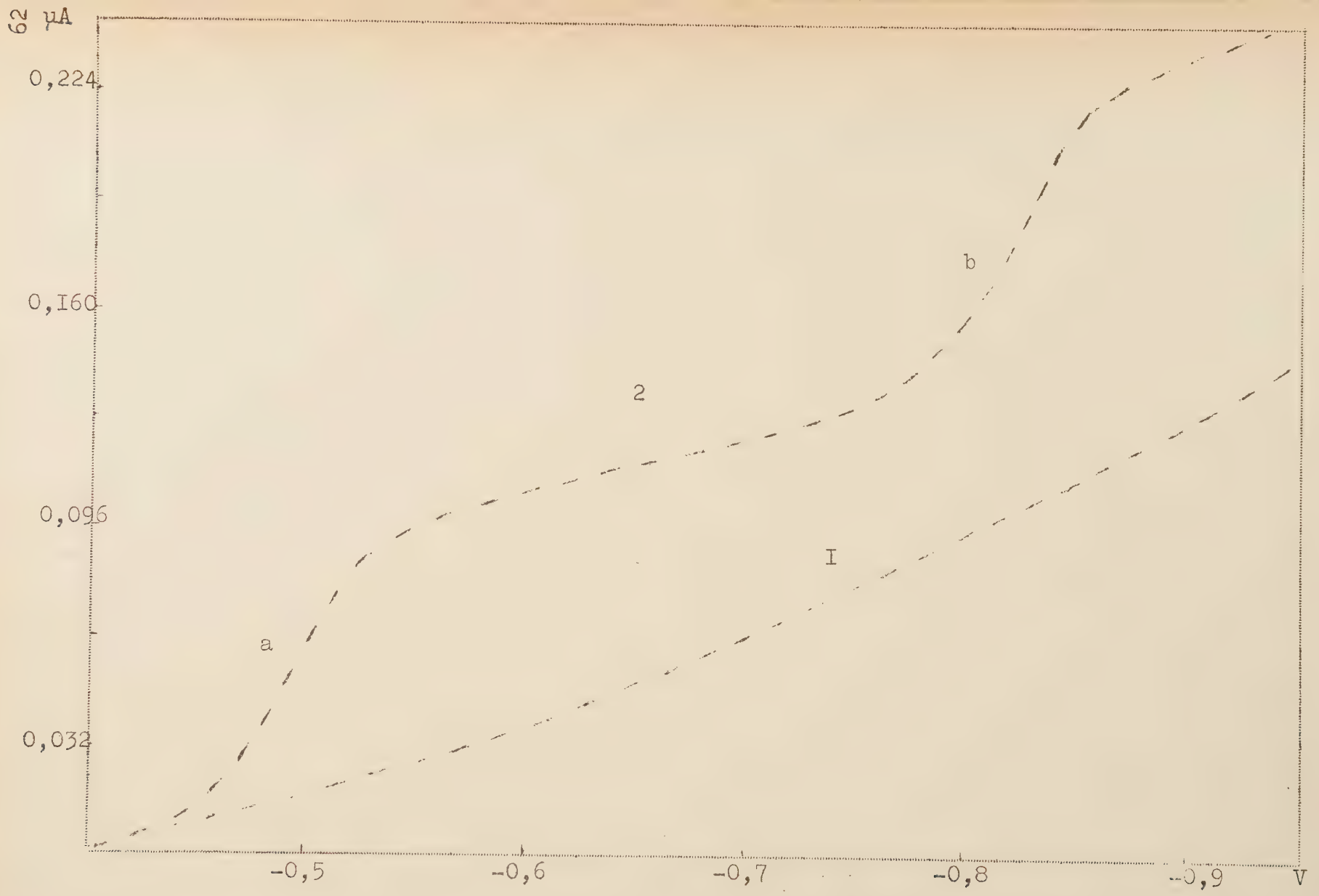


Fig. I2. Polarographie d'un mélange de colorants

1 tampon seul (sans compensation)

6. APPLICATIONS

61. APPLICATIONS INDUSTRIELLES

La technique polarographique que nous venons de décrire est susceptible de recevoir de nombreuses applications dans l'industrie, que ce soit au stade de la recherche, de la fabrication ou de l'utilisation. C'est ainsi que la methode proposée peut être utilisée pour suivre la fabrication du Rouge neutre qui comporte la formation intermédiaire de Bleu de toluylène. Il faut évidemment, pour calculer le rendement, se placer dans des limites convenables de concentration. Nous avons pu constater au cours de ce travail que le Bleu Capri utilisé avait un comportement polarographique quantitativement anormal et c'est la raison pour laquelle nous avons été amenés à le purifier.

Par ailleurs, une méthode rapide d'analyse de colorants peut avoir son intérêt dans les laboratoires de recherche de nombreuses industries (textiles, peintures, encres, réactifs biologiques, industries alimentaires). Nous avons pu identifier aisément, après simple extraction chloroformique, le colorant (violet hexaméthylé) d'une encre et d'un papier carbone. La méthode permet également de constater certaines incompatibilités, par exemple entre l'éosine (colorant acide) et le violet hexaméthylé (colorant basique).

La polarographie peut enfin rendre service au stade de l'utilisation pour déterminer les propriétés et la sensibilité d'un colorant. Nous avons pu, de la sorte, au cours de nos essais, constater, dans le cas du Rouge neutre ou de la Quinacrine, que le colorant en solution dans le tampon utilisé ne se conservait pas intact plusieurs jours de suite (altération ou précipitation).

62. APPLICATION BROMATOLOGIQUE

La pratique de l'addition de colorants aux aliments remonte à des temps très anciens, et, depuis l'apparition des colorants synthétiques, elle s'est généralisée à tel point qu'il a été nécessaire d'établir des limitations officielles et de fixer une liste des colorants utilisables et des denrées pour lesquelles l'addition est admise.

La règlementation d'emploi des colorants en Bromatologie n'est pas récente (dès Juin 1912 en France), mais elle est devenue ces dernières années beaucoup plus sévère en France comme à l'étranger, à la suite de différentes réunions internationales (Symposium de Bad-Godesberg 1954, Symposium de Rome 1956, Symposium d'Ascona 1957). Des listes de colorants "potentiellement dangereux" ont été publiés. De nombreux travaux (23b, 28, 49, 91) ont signalé les propriétés cancérigènes de certains colorants organiques. En ce qui concerne la France, l'arrêté du 9 Avril 1958 a interdit l'emploi - jadis permis - du vert malachite, du violet cristallisé, de l'auramine.

On comprend ainsi pourquoi, depuis quelques années, tant de travaux ont été consacrés à l'identification (principalement par les méthodes chromatographiques) des colorants alimentaires, et pourquoi il reste interessant d'avoir une méthode d'analyse permettant de déceler non seulement les colorants autorisés mais aussi les colorants interdits. Il semble que, dans ce domaine, la méthode polarographique vienne compléter heureusement la méthode chromatographique.

63 APPLICATION PHARMACEUTIQUE

Les colorants dans le domaine pharmaceutique sont utilisés soit pour exercer une action médicamenteuse, soit pour colorer les médicaments et les distinguer facilement les uns des autres lorsque la forme est la même (comprimés).

Depuis les travaux d'EHRLICH, plusieurs colorants basiques ont été préconisés pour leur action antiseptique ou trypanocide. . Leur emploi a diminué depuis quelques années, mais, cependant, le Violet de gentiane, la Quinacrine, ou le Bleu de méthylène etc... sont encore utilisés. Ils doivent, par suite, pouvoir être identifiés et dosés. C'est dans cet esprit que différents auteurs ont tenté d'appliquer la polarographie à l'analyse des médicaments colorants. BLAZEK (8) utilise cette méthode pour détecter les dérivés acridiniques; ZIMMER (97) décrit une technique polarographique pour doser l'acriflavine dans les différentes formes pharmaceutiques, obtenant ainsi un gain notable de précision sur les méthodes antérieures.

Cependant, si l'absorption de colorants doués d'activité thérapeutique est parfaitement justifiée, il est par contre discutable de les utiliser, comme c'est le cas actuellement , pour rendre plus attrayants les médicaments courants . Aussi bien, une liste limitative très stricte a-t-elle été établie (19, 20) définissant les colorants que l'on peut légalement ajouter aux diverses formes pharmaceutiques. L'intérêt de la méthode proposée, qui permet de contrôler rapidement si la règlementation est respectée par les fabricants, apparait donc comme évident.

64. APPLICATION TOXICOLOGIQUE

Les propriétés cancérigènes de certains colorants ne sont pas les seules qui intéressent le pharmacologue ou l'hygiéniste. Certains colorants possèdent une toxicité propre qui peut se manifester par des troubles en cas d'erreur de posologie. Les acridines utilisés comme médicaments ont été, comme le rappelle ALBAHARY (1), à l'origine d'accidents thérapeutiques, voire même d'accidents professionnels. Dans un autre ordre d'idées, les dérivés de l'acridine, la quinacrine par exemple, ont été utilisés par des fraudeurs en raison de la coloration jaune des téguments et des conjonctives qu'ils provoquent (faux ictères).

Dans tous les cas, il est intéressant de pouvoir identifier de manière certaine la présence de ces dérivés afin de pouvoir lutter convenablement contre leurs effets. Le métabolisme des dérives acridiniques a fait l'objet d'ouvrages spécialisés (95) ; nous rappellerons seulement que ces dérivés s'éliminent lentement dans les urines et que l'un des plus employés ,la Quinacrine, est excrétée en partie à l'état de 1-quinacrine et en partie à l'état de 2-chloro 5-amino 7-hydroxyacridine. Différentes réactions ont été utilisées jusqu'ici pour identifier ces dérivés, par exemple la fluorescence en lumière de Wood après extraction par l'alcool amylique. Ces réactions ne sont pas toujours très nettes et la substitution aux méthodes chimiques de la méthode polarographique semble particulièrement intéressante comme permettant de réaliser en un temps bref l'identification et le dosage d'un dérivé acridinique.

Les différentes phases de l'analyse sont les suivantes :

- extraction chloroformique d'un volume connu d'urine,
- séparation de la phase chloroformique par centrifugation,
- évaporation du chloroforme au bain-marie bouillant,
- reprise du résidu par une petite quantité (1ml) d'alcool méthylique et polarographie, en milieu tamponné, d'un volume connu de solution méthylique. On opère, comme à l'ordinaire, en présence d'un témoin.

7. RESUME ET CONCLUSIONS

71. RESUME

- Nous proposons dans ce travail la méthode polarographique comme méthode d'analyse qualitative et quantitative de différents colorants basiques.

- Une première partie a été consacrée à l'étude bibliographique des différentes techniques, autres que la polarographie, utilisées pour cette analyse (chromatographie, spectrométrie, électrophorèse) et à l'étude bibliographique plus poussée de la polarographie elle-même.

- Une deuxième partie décrit de manière détaillée l'appareillage utilisé lors de nos essais. Nous y envisageons aussi différentes améliorations surtout en ce qui concerne la sensibilité.
Un chapitre spécial a trait aux conditions opératoires et à différents détails techniques de manipulation.

- La troisième partie du travail se rapporte à l'analyse qualitative et quantitative de colorants basiques appartenant à différentes séries chimiques dont la structure se rattache à celle du triphénylméthane (acridines, diazines, thiazines, oxazines). Quelques colorants basiques de la série azoique ont été également étudiés.
L'analyse qualitative de colorants basiques en mélange a été envisagée. Un certain nombre d'applications pratiques sont décrites.
Notre travail autorise, semble-t-il, les conclusions suivantes :

72. CONCLUSIONS

- La méthode polarographique semble particulièrement intéressante pour l'analyse qualitative et quantitative des colorants basiques alors que les techniques chromatographiques et électrophorètiques ne permettent d'effectuer cette analyse que dans certains cas particuliers (acridines).

- Nos essais ont porté spécialement sur des colorants basiques de structure se rattachant à celle du triphénylméthane (acridines, diazines, thiazines, oxazines).

- La méthode proposée permet de déceler et de doser 30 µg d'un colorant connu avec une précision de ± 5 pour 100, à condition d'opérer en présence d'étalons et de suivre un mode opératoire rigoureusement identique lors des différents essais.

- Sur les autres méthodes proposées la polarographie a l'avantage d'être simple et rapide (environ 20 minutes par essai).

- L'analyse qualitative par polarographie de mélanges de colorants a également été envisagée : la méthode est susceptible de résoudre le problème dans de nombreux cas.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBAHARY (C.) - Maladies médicamenteuses d'ordre thérapeutique et accidentel.
Ed. Masson, 1953.

2 - ALBERT (A.) - The Acridines. E.Arnold and Co. London 1950.

3 - ARTHUR (P.) KOMYATHY (J.C.) MANESS (R.F.) VAUGHAN (H.W) - New polarographic electrode employing controlled stirring.
Anal. Chem. 1955, 27, 895-898.

4 - BADINAND et BOUCHERLE - Applications of polarography to the analysis of several polyethylene glycols and their derivatives.
Cong. Soc. Pharm. France. 9ème. Clermont-Ferrand, 1957, 147-155. et Bull. Soc. Chim. 1957, 1021.

5 - BENESCH (R.E.) BENESCH (R.) - Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods.
Science 1953, 118, 447-448. C.A. 1954, 48, 2139a.

6 - BERG (H.) - Comparative polarographic investigation on dyes.
Chem. Tech. (Berlin) 1954, 6, 585-590.
C.A. 1955, 49, 9400d.

7 - BIFFEN (F.M.) SEAMAN (W.) - Modern Instruments in chemical analysis.
Mc Graw-Hill Book Company 1956.

8 - BLAZEK (A.) KALVODA (R.) ZYKA (J.) - Determination of some pharmaceutically used acridine derivatives.
Casopis Ceskeho Lekarnictva 1950, 63, 138-145. C.A. 1952, 46, 7767 i.

9 - BLOCK (R.J.) DURRUM (E.L.) ZWEIG (G.) -A manual of paper chromatography and paper electrophoresis.
Academic press inc. publishers. New-York 1958.

10(a)- BRDICKA (R.) - The adsorption of reduced methylene blue on the dropping-mercury electrode.
Z. Elektrochem. 1942, 48, 278-288. C.A. 1943 37, 5661.

10 (b)- BRDICKA (R.) - Measurements of quantities concerning the adsorption of certain reducible compounds or their reduction products at the dropping mercury electrode.
Coll. Czechosl. Chem. Communs 1947, 12, 522.

11 - BREYER (B.) BUCHANAN (G.S.) DUEWELL (H.) - The reduction potentials of acridines with reference to their antiseptic activity.
J. Chem. Soc. 1944, 360.

12 - BREZINA (M.) ZUMAN (P.) - Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy.
Interscience publishers. New-York 1958.

13 - CHARLOT (G.) BADOZ-LAMBLING (Mme) TREMILLON (B.) - Les réactions électrochimiques. Méthodes électrochimiques d'analyse.
Ed. Masson, 1959.

14 - CHARLOT (G.) - Modern electroanalytical methods.
Symposium Paris 1957. Elsevier Ed. 1958.

15 - COBRAL (J. de O.) TURNER (H.A.) - The polarography of azo dyes.
J. Soc. Dyers Colourists, 1956, 72, 158-167.
C.A. 1956, 50, 9021 f.

16 - COLOUR INDEX - Printed and bound by Chorley and Pickersgill Ltd leeds, England. Second edition, 1956, in four volumes.

17 - COOKE (W.D.) - Extension of sensitivity of polarographic analysis with rotating amalgam electrodes.
Anal. Chem. 1953, 25, 215-218.

18 - COOPER (J.) - The use of colorants as drugs and in drugs.
J. Am. Pharm. Assoc. (Pract. Edit.) 1956, 17, 640-643.

19 - COUSTOU (F.) - La règlementation de l'emploi des colorants.
Labo Pharma 1958, n°51.

20 - DEGAND (P.) - Coloring matters from the viewpoint of their usage in medicines and of their control.
J. Mondial Pharm. 1958, 390-401;
C.A. 1959, 53, 18386 c.

21 - DELAHAY (P.) - La réduction polarographique de la fluorescéine.
Bull. Soc. Chim. 1948, 348.

22 - DOMANGE (L.) - Eléments de Polarographie. Conf. Soc. Techn. Pharm.

23 (a) - DORLET (C.) - Contribution à l'étude de quelques colorants rouges du groupe de l'ac. naphtionique.
J.Pharm. Belgique 1959, n°5-6, 227-231.

23 (b) - DORLET (C.) - Considérations sur l'utilisation et la caractérisation des colorants alimentaires.
J. Pharm. Belg. 1959, 41, n°3-4, 159-164.

24 - DREVON (B.) LAUR (J.) - Nouvelle méthode d'expertise des colorants alimentaires. Emploi des ammoniums quaternaires.
Ann. Fals. Fraudes n°604. Avril 1959.155-161.

25 - DREVON (B.) CIER (A.) MAURER (J.) - Analyse chromatographique d'échantillons "Codex" de mercurescéine sodique.
Société de Pharmacie de Lyon, séance du 17 Décembre 1958.

26 - DREVON (B.) THUREL (J.) - Polarographie des colorants basiques.
Ann. Fals. Fraudes (à paraître)

27 - EVANS (E.E) WALLS (K.W.) - The separation of biological stains by paper electrophoresis.
J. Bact. 1952, 63, 422.

28 - FABRE (R.) - Les substances étrangères ajoutées aux aliments. Reflexions d'un toxicologue.
J. Pharm. Belgique, 1958, 4, 99-116.

29 - FEIGL (F.) - Spot tests in organic analysis. Elsevier 1956.

30 - GILLAM (A.E.) STERN (E.S.) - "An introduction to electronic absorption spectroscopy in organic chemistry".
E. Arnold Publishers. London 1957.

31 - GREEN - Analysis of dyestuffs. Ch. Griffin and Co. Publishers. London.

32 - HAMMICK (D.L.) MASON (S.F.) - Some physico-chemical properties of acridine anti-malarials with reference to their biological action.
J. Chem. Soc. 1950, 345.

33 - HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS. Chemical Rubber Publish. Co. Cleveland , Ohio, 1955.

34 - HASSELBACH (H.) JAHN (D.) SCHWABE (K.) - Experimental investigations on polarographic maxima.
Z. physik. Chem. 1958, 17-27.
C.A. 1959, 53, 4968 b.

35 - HEYROVSKY (J.) ZUMAN (P.) - Einfuhrung in die praktische Polarographie. Veb Verlag Technik Berlin 1959.

36 - HUME (D.N.) - Polarographic theory, instrumentation and methodology.
Anal. Chem. 1956, 28, 625.
1958, 30, 675.

37 - IIZUKA (M.) - The polarograms of methylène blue and toluidine blue. Denki Kagaku 1956, 24,567-571.
C.A. 1957, 51, 14 447 d

38 - JENSOVSKY (L.) - New type of polarographic microvessel.
Chem. Listy 1956, 50, 398-399.
C.A. 1956, 50, 7621 e.

39 - KALOUZEK (M.) RALEK (M.) - Investigation of processes at the dropping mercury electrode with the aid of a discontinuously changing polarizing potential. Proof of adsorption; identification of electrolytic products.
Coll. Czechosl. Chem. Communs, 1954, 19, 1099-1110.

40 - KAYE (R.C.) - Polarographic investigation of the redox characters of amino-acridines considered in relation to antibacterial action.
J. Pharm. Pharmacol. 1950, 8, 902-918.

41 (a) - KAYE (R.C.) STONEHILL (H.I.) - The polarographic reduction of some amino-acridines.
J. Chem. Soc. 1951, 27 et 2638.

41 (b) - KAYE (R.C.) STONEHILL (H.I.) - The polarographic reduction of crystal-violet, brilliant-green , malachite green and auramine.
J. Chem. Soc . 1952, 3231.

41 (c) - KAYE (R.C.) STONEHILL (H.I.) - Polarographic reduction of some natural and artificial hydrogen-carriers in bacterial enzyme systems.
J. Chem. Soc. 1952, 3244-3247.

41 (d) - KAYE (R.C.) STONEHILL (H.I.) - The polarographic reduction of pyridine, quinoline and phenazine.
J. Chem. Soc. 1952, 3240-3243.

42 - KEILIN (B.) - Adsorption at the dropping-mercury electrode.
J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 1934.

43 - KING (E.J.) GILCHRIST (M.) TARNOKY (A.L.) - Biochem. J. 1946, 40, 706.

44 - KLING - Méthodes actuelles d'expertise. Ed. Dunod. 1923.

45 - KITAGAWA (S.) TOYODA (K.) - Polarography of japanese offiial food dyes.
Eisei Shikenjo Hokoku 1956, 74, 243-245,
C.A. 1957, 51, 8315d.

46 - KOLTHOFF (I.M.) LINGANE (J.J.) - Polarography. Interscience Publishers. New-York. London 1952.

47 - KOLTHOFF (I.M.) LEHMICKE (D.J.) - Polarographic behavior of phénolphtaléine.
J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 1879.

48 - KOLTHOFF (I.M.) OKINAKA (Y.) - Factors to be considered in quantitative polarography with the rotated dropping-mercury electrode.
Anal. Chim. Acta, 1958, 18, 83.

49 - KUIPER (L.) - Coloration des produits alimentaires en vue de les rendre plus attrayants à l'oeil. Liste des colorants synthétiques admis à être ajoutés aux produits alimentaires par la législation de 27 pays (tableau synoptique).
Chem. Weekbl., Nederl. 1959, 55, n°48, 684-689.

50 - LAITINEN (H.A.) BURDETT (L.W.) - Amperometric titration cell for use with dropping mercury electrode.
Anal. Chem. 1950, 22, 833-835.

51 - LANGER (A.) - Evaluation of paper chromatograms by direct polarographic scanning.
Anal. Chem. 1956, 28, 426.

52 - LAUR (J.) - Thèse Doctorat Université (Phie) n°466, Lyon 24 Juin 1958.

53 - LEBEAU (P.) JANOT (M.M.) - Traité de Pharmacie Chimique. 4, Ed. Masson 1955-1956.

54 - LEDERER (M.) - The partition chromatography of acridines. Anal. Chim. Acta 1952, 6, 267.

55 - LEDERER (E.) LEDERER (M.) - Chromatography. A review of principles and applications. Elsevier Ed.1957.

56 - LEDERER (E.) - Chromatographie en Chimie Organique et biologique. Ed. Masson 1959.

57 - LEDERER (M.) - An introduction to paper electrophoresis and related methods. Elsevier Ed. 1957.

58 - LEE (T.S.) - Electrochemical phenomena at a rotating mercury electrode. Reduction of metal ions. J. Am.Chem. Soc. 1952, 74, 5001-5008.

59 - LEGRAND (P.) - Identification par microélectrophorèse de faibles quantités de colorants alimentaires synthétiques. Ann. Fals. Fraudes 1958, n°589-590, 5-18 et 1959, n°601, 5-12.

60 - LHOEST (W) - Colorants synthétiques en usage dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Nouvelle méthode d'extraction, de séparation, d'identification et de dosage. J. Pharm. Belgique, 1953, 8, n°3-4, 119-145; n°5-6, 260-282; n°7-8, 371-391.

61 - LINGANE (J.J.) GARDNER SWAIN (C.) FIELDS (M.) - Polarographically controlled syntheses with particular reference to organic chemistry. J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 1348.

62 - LOISELEUR (J.) - Techniques de Laboratoire. Ed. Masson 1954.

63 - LORENZ (W.) SCHMALZ (E.O.) - Kinetics of adsorption and desorption of methylene blue/leucomethylene blue and eosin at the mercury electrode. Z. Elektrochem.1958, 62, 301-306. C.A. 1959, 53, 2876h.

64 - MARPLE (T.L.) ROGERS (L.B.) - Polarographic studies with a stationary mercury-plated platinum electrode.
Anal. Chem. 1953, 25, 1351-1354.

65 - MEITES (L.) - Polarographic techniques. Interscience Publis.
New-York 1955.

66(a) - MEITES (L.) MEITES (T.) - Some polarographic effects of gelatin and other maximum suppressors.
J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 177-183.

66(b) - MEITES (L.) MEITES (T.) - Micro H-cell for polarographic analysis.
Anal. Chem. 1951, 28, 1893.

66(c) - MEITES (L.) MEITES (T.) - Cell for rapid polarographic analysis.
Anal. Chem. 1951, 23, 1194.

67 - MELLON (M.G.) - Analytical absorption spectroscopy.
John Wiley and sons, Inc. 1950.

68 - MICHAELIS (L.) SCHUBERT (M.P.) GRANICK (S.) - Semiquinone radicals of the thiazines.
J. Am. Chem. Soc. 1940, 62, 204-211.

69 - MILNER (G.W.C.) - The principles and applications of Polarography and other electroanalytical processes.
Ed. Longmans, Green and Co 1956.

70 - MULLER (O.H.) - Oxidation-reduction potentials measured with the dropping-mercury electrode. Anomalous polarographic waves in dilute solutions of certain dyes.
Trans. Electrochem. Soc. 1945, 87, 441.

71 - PEURIFOY (P.W.) SCHRENK (W.G.) - Characteristics of stationary mercury electrode.
Anal. Chem. 1957, 29, 410-414.

72 - RADLEY (J.A.) GRANT (J.) - Fluorescence analysis in ultraviolet light.
Chapman and Hall. London 1954.

73 - ROSIE (D.J.) COOKE (W.D.) - Polarography with a mercury pool cathode in stirred solutions.
Anal. Chem. 1955, 27, 1360.

74 - RUGGLI (P.) JENSEN (P.) - Helv. Chim. Acta 1935, 18, 624; 1936, 19, 64.

75 - RUGGLI (P.) STAUBLE (M.) - Helv. Chim. Acta 1940,23, 689.

76 - RUS'YANOVA (N.D.) - Polarographic method of determination of acridine in the analysis of coal- tar bases.
Zavodskaya Lab. 1959, 25, 1069.
C.A. 1960, 54, 8416f.

77 - SAENZ-LASCANO-RUIZ (Mme) CHOVIN (P.) MOUREU (H.) - La séparation chromatographique des colorants alimentaires et son application à la détection des fraudes.
Ed. Hermann et Cie 1948.

78 - SAENZ-LASCANO-RUIZ (Mme) - Extraction et identification des colorants synthétiques incorporés aux aliments.
Ann. Fals. Fraudes 1956, n°571-572, 315-332.

79 - SATO (H.) - Polarography of chrysoidine. Eisei Shikenjo Hokoku 1957, 75, 47-50.
C.A.1958, 52, 16088i.

80 - SCHWABE (K.) BERG (H.) - Measurements of speeds of reaction by aid of the polarograph.
Z.Physik. Chem.(Leipzig)1955, 204, 78-109.
C.A. 1956, 50, 80d.

81 - SOUCHAY (P.) - Analyse polarographique en chimie organique.
Chim. Anal. 1959, 41, 445-455 et 471-475.

82 - STREULI (C.A.) COOKE (W.D.) - Polarographic behavior of organic compounds at the mercury pool electrode. Anal. Chem. 1954, 26, 963-970.

83 - STRICKS (W.) KOLTHOFF (I.M.) - The rotated dropping mercury electrode as a new electrode in Polarography.
J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 2085.

84 - TACHI et Coll. - Mem. Coll. Agr. Kyoto Imp. Univ. 1931, 17 45; 1937, 40, 1-11; 1938, 42, 1-36.

85 - TACHI (I.) TSUKAMOTO (T.) - Polarographic studies of organic compounds-Methylene blue.
J. Agr. Chem. Soc. Japan 1951, 25, 436-441.
C.A. 1953, 47, 11035e.

86 - TAMAMUSHI (R.) YAMAMOTO (S.) TAKAHASHI (A.) TANAKA (N.) - Effect of gelatin and polyoxyethylene lauryl ether on polarographic diffusion current of some inorganic ions.
Anal. Chim. Acta. 1959, 20, 486-493.

87 - TAMAMUSHI (R.) YAMANAKA (T.) - The effect of some surface active substances on the polarographic reduction process of metallic ions.
Bull. Chem. Soc. Japan 1955, 28, 673-679.
C. A. 1956, 50, 6972d.

88 - TANAKA (N.) KOIZUMI (T.) MURAYAMA (T.) KODAMA (M.) SAKUMA (Y.) - The use of the rotated dropping mercury electrode in polarographic analysis and amperometric titrations of a micromolar solution.
Anal. Chim. Acta 1958, 18, 97-103.

89 - THALER (H.) SOMMER (G.) - Dye Analysis. Paper chromatographic separation of water-soluble tar dyes.
Z.Lebensm. Untersuch. u. Forsch. 1953, 97, 345-365. C.A. 1954, 2376h.

90 - TRUHAUT(R.) - Sur l'utilisation des colorants en thérapeutique et les dangers qui peuvent en résulter pour la santé humaine.
Sem. Hôpitaux Nov. 1958.

91 - TRUHAUT (R.) - Compte-rendu du symposium sur les risques de cancérisation pouvant résulter de la présence de substances étrangères dans les aliments. Rome , août 1956.
Ann. Fals. Fraudes. 1958, n°589-590, 19-28.

92 - VOJIR (V.) - Catalytic evolution of hydrogen on the dropping-mercury electrode caused by azines, oxazines and thiazines.
Coll. Czechosl. Chem. Communs. 1953, 18 629-631.
Chem. Listy 1953, 47, 634-635.
C.A. 1954, 48, 3813i.

93 - WAWZONEK (S.) - Organic Polarography. Anal. Chem. 1949, 21, 61; 1954, 26, 65; 1956, 28, 638; 1958, 30, 661.

94 - WIESNER (K.) - Overvoltage of oxido-reduction at the dropping-mercury electrode caused by the adsorption layer of dyes of the eosin group.
Coll. Czechosl. Chem. Communs. 1947, 12, 594-606.

95 - WILLIAMS (R.T.) - Detoxication mechanisms. Chapman and Hall. 1949.

96 - ZAGORSKI (Z.) - New methods of polarographic microanalysis. Chem. Anal. (Warsaw) 1956, 1, 199-245.
C.A. 1957, 51, 4171f.

97 - ZIMMER (A.J.) MANSUR (K.) - The polarographic determination of acriflavine.
J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Edit.) 1955, 44, 204-206.

98 - ZUMAN (P.) - A list of half-wave potentials. Coll. Czechosl. Chem. Communs. 1950, 15, 1118-1201.

ORIGINE DES COLORANTS ETUDIES

	Numéro du C.I 1956	Origine
Diphénylméthane		
Auramine O	41.000	CIBA
Triphénylméthane		
Fuchsine basique	42.510	BIOLYON
Parafuchsine		CIBA
Violet hexaméthylé	42.555	R.A.L. KUHLMANN
Vert malachite	42.000	R.A.L. KUHLMANN
Vert de méthyle		B.L.B.
Acridines		
Rivanol		I.G. FARBEN-INDUSTRIE.
Acridine Orange R	46.055	SERLABO (GURR'S.England)
Acriflavine	46.000	-"Trypaflavin" CASSELLA -"Gonacrine" SPECIA
Quinacrine		Quinacrine SPECIA
Acridine		TOUZART et MATIGNON (EASTMAN-KODAK).

Azines

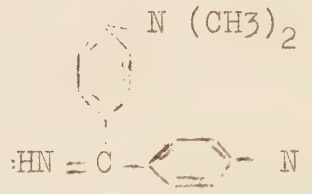
Bleu de toluylène	49.410	-TOUZART et MATIGNON (GURR'S-England) -CIBA
Rouge neutre	50.040	R.A.L. KUHLMANN
Phénosafranine	50.200	TOUZART et MATIGNON (GURR'S - England)
Mauvéine	50.245	CIBA
Bleu de méthylène	52.015	-R.A.L. KUHLMANN - MERCK
Thionine	52.000	POULENC frères
Bleu Capri	51.015	TOUZART et MATIGNON (GURR'S - England)
Bleu de Meldola	51.175	R.A.L. KUHLMANN

Azoiques

Chrysoidine R	11.270	CIBA
Brun Bismarck	21.000	POULENC frères

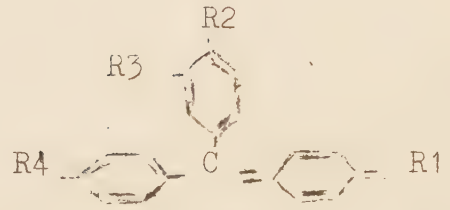
FORMULES DES COLORANTS ETUDIES

DIPHENYLMETHANE



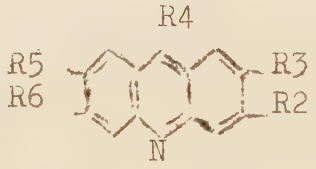
Auramine O

TRIPHENYLMETHANE



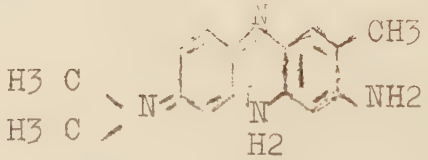
	R1	R2	R3	R4
Vert de méthyle	$N(CH_3)_3$	$N(CH_3)_2$	H	$N(CH_3)_2$
Vert malachite	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$	H	H
Violet cristallisé	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$	H	$N(CH_3)_2$
Fuchsine basique	NH_2	NH_2	CH_3	NH_2
Parafuchsine	NH_2	NH_2	H	NH_2

ACRIDINE



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Acridine	H	H	H	H	H	H
Acriflavine	CH_3	NH_2	H	H	H	NH_2
Acridine Orange R	H	$N(CH_3)_2$	H	C6H5	H	$N(CH_3)_2$
Rivanol	H	H	NH_2	NH_2	OC_2H_5	H
Quinacrine	H	H	OCH_3	NH $\overset{CH-(CH_2)_3-N(C_2H_5)_2}{\underset{CH_3}{\vert}}$	H	Cl

AMINO-INDAMINE

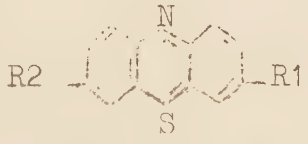


Bleu de toluylène

DIAZINE

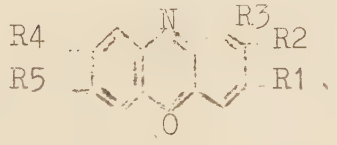
	R1	R2	R3	R4	R5
Rouge neutre	H	NH2	CH3	H	$N(CH_3)_2$
Phénosoframine	C6H5	NH2	H	H	NH2
Mauvéine	C6H4(CH3)	NH2	CH3	CH3	N--C6H5 H

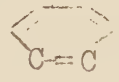
THIAZINE



	R1	R2
Thionine	NH2	NH2
Bleu de méthylène	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$

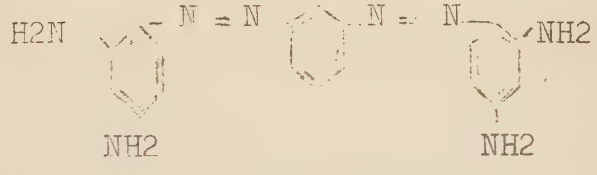
OXAZINE



	R1		R4	R5
Bleu Capri	N(CH3)2		CH3	N(C2H5)2
Bleu de Meldola	H		H	N(CH3)2

AZOIQUE

Chrysoidine



Brun Bismarck

VU et permis d'imprimer
Lyon, le 5 Novembre 1960

VU, le Doyen

H. HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS